

SR Cajal

# Genes y redes génicas que actúan durante el desarrollo temprano del sistema visual de *Drosophila*

Tesis doctoral  
Cristina Piñeiro López



## **Tesis Doctoral**

# **Genes y redes génicas que actúan durante el desarrollo temprano del Sistema visual de *Drosophila***

**Cristina Piñeiro López**

**Director: Dr. Fernando Casares Fernandez**

**Tutor: Dr. Manuel Muñoz Ruiz**

**Mayo 2017**







Abreviaturas	1 – 4
Resumen	5 – 7
INTRODUCCIÓN GENERAL	
1. Introducción	8 – 9
2. Objetivos	10 – 12
3. Organismo modelo. <i>Drosophila melanogaster</i>	12 – 15
4. Técnicas genéticas para el estudio de la función de genes en <i>Drosophila</i>	15
4.1 Sistema Gal4-UAS en <i>Drosophila</i>	16 - 18
4.2 Sistema Gal4 activado por un promotor inducible por choque térmico	18
4.3 Generación de clones. Sistema FRT/FLP	18 - 20
4.4 Clones FLP-OUT	20 - 22
4.5 Clones MARCM	23
4.6 Líneas reporteras	23 - 25
ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA VISUAL DE DROSOPHILA	
5. Desarrollo del sistema visual durante embriogénesis	26 - 28
6. Desarrollo del primordio de ojo compuesto	28 - 31
7. Genes específicos durante el desarrollo temprano de la retina (RDG) en <i>Drosophila</i>	31
7.1 <i>ey/toy/Pax6</i>	32
7.2 <i>hth/Meis/Prep</i>	32
7.3 <i>eyes absent (eya)</i>	33 - 34
7.4 <i>sine oculis (so)</i>	34 - 35
7.5 <i>dachshund (dac)</i>	35 - 36
7.5 <i>teashirt/tiptop (tsh/tio)</i>	36 - 37
8. Redes génicas que actúan durante el desarrollo de la retina de <i>Drosophila</i>	37
9. Desarrollo del primordio de globo óptico	38 - 42
10. Modelo de vertebrados. Desarrollo del ojo de vertebrados	
(i) La inducción neural en el presunto ectodermo	43 - 45
(ii) La subdivisión antero-posterior de la placoda neural	45 - 47
(iii) Especificación y separación de la región del ojo	47 - 48



(iv) Generación y modelado de la vesícula óptica	48 - 49
(v) Regionalización de la copa óptica de la retina y el epitelio pigmentario de la retina	49 - 52
(vi) Especificación y diferenciación de los siete tipos de células retinianas	52 - 59

## CAPÍTULO PRIMERO

Introducción	60 - 63
--------------	---------

1. Diferencias y similitudes entre la retina de vertebrados y la retina de *Drosophila*.
2. Morfología y desarrollo del globo óptico.
3. Descripción de los patrones de los genes utilizados como marcadores del OL y la lámina durante el desarrollo larvario del globo óptico de *Drosophila*
4. Orientación del globo óptico.

Resultados	63 - 108
------------	----------

1. Patrón de expresión de los genes Pax6 (*ey/toy*).
2. Patrones de expresión de *eyes absent (eya)*, *sine oculis (so)* y *homothorax (hth)*.
3. *eya/so* son requeridos para la expresión de *dac*.
4. *hth* es requerido en el neuroepitelio para promover el crecimiento y para modular la extensión y niveles de expresión de *eya*.
5. Relación de los genes *hth/eya/so/dac* con la vía Hh.
6. La represión de *hth* en las células de la lámina es necesaria para la regulación positiva de *sim*.
7. Relación de los genes *hth/eya/so/dac* con las vías de señalización Dpp (BMP4) y Wingless (Wnt).
  - 7.1 Dpp y Wg durante el desarrollo del disco imaginal de ojo.
  - 7.2 Vías de señalización de Wg/Wnt y Dpp/BMP4 durante el desarrollo de los globos ópticos.
8. Modelo propuesto para el desarrollo larvario de la lámina.

Discusión	109 - 113
-----------	-----------

Materiales y Métodos	114 – 116
----------------------	-----------

## CAPITULO 2

### Primera parte

Introducción	117 – 123
--------------	-----------

Resultados	124 - 131
------------	-----------

1. Expresión relativa de los homólogos de los genes *Fezf* e *lrx* en el SNC en desarrollo de *Drosophila*
2. *Fezf* en el sistema visual de *Drosophila*.

Discusión	132 – 133
-----------	-----------

Materiales y métodos	133
----------------------	-----

### Segunda parte

Introducción	135 – 137
--------------	-----------

Resultados	138 –150
------------	----------

1. Estructura proteica del gen *Fezf* y comparativa a nivel de proteína entre diferentes especies.
2. Expresión de *Fezf2* en distintos modelos de desarrollo de retina en vertebrados.
  2. 1 Expresión de *Fezf2* en pez cebra (*Danio rerio*).
3. Caracterización de la expresión de *Fezf2* en ratón
  - 3.1 Expresión de *mFezf2* en retina.
  - 3.2 Expresión de *mFezf2* en cerebro adulto.
4. Caracterización de la expresión de *Fezf2*\* en embrión de pollo.

Discusión	152 – 158
-----------	-----------

Materiales y métodos	160 – 170
----------------------	-----------

## REFERENCIAS

## ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AEL:	Tras la eclosión de la larva
A-P:	Anterior-Posterior
APC:	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AMPc:	Adenosin monofosfato cíclico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNi:	ARN de interferencia
ARNm:	ARN mensajero
BMP:	Bone Morphogenetic Protein
C:	Córnea
CB:	Hemisferio cerebral
Ci:	Cubitus interruptus
Ci-A:	Forma activada de Ci
CNG:	Activados por nucleótidos cíclicos
CO:	Copa óptica
DA:	Dopaminérgicas
Dac:	Dachsund
DE-cad:	DE-cadherin
Dll:	Distal-less
DP:	Disco principal
Dpp:	Decapentaplegic
DTB:	<i>Deuterocerebral-Tritocerebral Boundary</i>
DTT:	Dithiothreitol
D-V:	Dorso-Ventral
ED:	Disco de ojo
EP:	Primordio de ojo
EAD:	Disco de ojo-antena
EADCs:	Complejos de disco ojo-antena
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
En:	Engrailed
Exd:	Extradenticle
Ey:	Eyeless
Eya:	Eye Absent
Eyg:	Eyegone
FasII:	Fasciclina II
Fez:	Forbrain embryonic zinc-finger
FGF:	Factor de crecimiento de los fibroblastos
FLP:	Flipasa
FR:	Fotorreceptor
FRT:	Flip Recognition Target
FT:	Factor de Transcripción
GDR:	Genes determinantes de la Retina
GFP:	Green Fluorescent Protein
GCL:	Capa de células ganglionares
GMC:	Célula madre ganglionar



GMPC	Guanosin monofostato cíclico
Gro:	Groucho
HC:	Hipocampo
HD:	Homeodominio
Hh:	Hedgehog
HM:	Homeodominio-meis
hpARN:	horquilla de ARN
hpf:	Horas post-fertilización
Hth:	Homothorax
I:	Irises
INL:	Capa interna nuclear
IOA:	Inner optic anlage (primordio interno de los globos ópticos)
IPC:	Centro proliferativo interno (de los globos ópticos)
IP <sub>3</sub> :	Inositol-1,3,5 trifosfato
Irx:	Genes Iroquois
IsO:	<i>Isthmus Organizer</i>
KD:	Knock-Down
L:	Lámina
L1:	Estadio larvario 1
L2:	Estadio larvario 2
L3:	Estadio larvario 3
LE:	Epitelio de la lente
LF:	Surco de la lámina
LP:	Placoda de la lente
LPCs:	Células precursoras de la lámina
L'sc:	Lethal of scute
LV:	Vesícula de la lente
M:	Mesénquima
MB:	<i>Mushroom bodies</i>
Mirr:	Mirror
Me/M:	Médula
MF:	Surco morfogénico (Morphogenetic furrow)
MHB:	<i>Midbrain-hindbrain boundary</i>
NB:	Neuroblastos
Ne:	Neuroepitelio
NR:	Retina neural
NSCs:	Células madre neuronales
OB:	Órgano de Bolwig
OL:	Globos ópticos
ON:	Nervio óptico
ONL:	Capa externa nuclear
OSNs:	Neuronas sensitivas olfatorias
OOA:	Outer optic anlage (primordio externo de los globos ópticos)
OP:	Primordio de globo óptico
OPC:	Centro proliferativo externo (de los globos ópticos)
OS:	Tallo óptico
Otd:	Orthodenticle

PCM:	Mesodermo precordial
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD:	Dominio <i>paired</i>
P-D:	Próximo-Distal
PDE:	Fosfodiesterasa
PE:	Epitelio peripodial
PIP <sub>2</sub> :	Fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PLC:	fosfolipasa C
PLE:	Región del ectodermo del primordio de la lente
PN:	Proneural
PNR:	Primordio de retina neural
POS:	Primordio del tallo óptico
PPN:	Pre-proneural
PR:	Fotorreceptor
Ptc:	Patched
RDGs:	Genes de determinación de la retina
RG:	Red génica
RISC:	RNA-induced silencing <i>complex</i>
RGC:	Células ganglionares de la retina
RMS:	Corriente migratoria rostral
RPCs:	Células progenitoras de la retina
RPE:	Epitelio pigmentado de la retina
RRG:	Red de Regulación Génica
SNC:	Sistema nervioso central
Shh:	Sonic Hedgehog
MF:	Surco morfogenético
Sim:	Single minded
SGL:	Capa subgranular
Smo:	Smoothened
So:	Sine oculis
SVZ:	Zona subventricular
TALE:	<i>Transcription activator-like effector</i>
Tio:	Tiptop
Tkv:	Thickveins
Toy:	Twin of eyeless
Tsh:	Teashirt
Upd:	Unpaired
Unpg:	Unplugged
VDRC:	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i>
VF:	Cerebro rostral ventral
VNC:	Cordón nervioso ventral
VO:	Vesícula óptica
VZ:	Zona ventricular
UAS:	Upstream Activator Sequence
Wg:	Wingless
WT:	<i>Wild type</i>
Yki:	Yorkie

ZF:       Pez cebra  
ZLI:      *Zona limintans intrathalámica*



## RESUMEN

La presente tesis se divide en dos capítulos relacionados entre sí. El nexo de unión o principio básico que se persigue en ambos estudios no es otro que el de ampliar el conocimiento sobre la coordinación entre los procesos de crecimiento y diferenciación de los tejidos para formar un órgano. En ambos casos se utiliza como modelo de estudio los tejidos que forman el sistema visual.

En un primer capítulo se aborda el estudio de una red de regulación génica altamente conservada en el desarrollo del sistema visual desde invertebrados a vertebrados, conocida como “red de genes de especificación del ojo”. Si bien se conoce cuan conservada está la red de genes de especificación del ojo, hasta ahora su estudio en *Drosophila* se ha centrado en su función durante el desarrollo de la retina. En *Drosophila*, la retina contiene únicamente los fotorreceptores y células accesorias, siendo las neuronas que procesan la información visual emplazadas en un órgano que recibe el nombre de globo óptico. Cada uno de los ojos compuestos o retinas es innervado por un globo óptico (“Optic Lobes” OL) en estrecho contacto con el hemisferio cerebral, donde en última instancia se recibe la información visual. Cada OL está compuesto por diferentes ganglios, de interior a exterior son: el complejo de la lóbula, la médula y la lámina. Lámina y médula forman un anillo abierto en forma de herradura sobre el complejo de la lóbula. Si bien hay varios estudios sobre el desarrollo de la médula y la diferenciación de los neuroblastos para formar este ganglio, poco se sabe sobre el proceso de diferenciación de la lámina, a pesar de ser el primer centro neuronal con el que contactan los axones de los fotorreceptores. El ojo compuesto de *Drosophila* tiene 6 fotorreceptores externos y dos internos (7 y 8). De ellos, los 6 primeros innervan la lámina directamente y los otros dos atraviesan la lámina para llegar a la médula donde contactan con sus respectivas neuronas diana de forma estereotipada.

En esta tesis, se ha hecho un estudio comparativo sobre el papel de la red de regulación génica que opera durante el desarrollo de la retina en *Drosophila* y también en el desarrollo de ojo de vertebrados, para ver analizar su relevancia durante el desarrollo de la lámina. Esta red de genes de especificación del ojo está compuesta por los genes Pax6>Eya=Six1/2>Dach. Así mismo otras vías de señalización importantes para el desarrollo del sistema visual fueron testadas por su relación con la anterior, como puedan ser las vías de señalización Hh/Shh, Dpp/BMP y Wg/Wnt.

Como resultado de este estudio, encontramos muchas similitudes y también ciertas diferencias remarcables. Durante el desarrollo de la lámina, Eya y Six1/2 (en *Drosophila sine culis, so*) se regulan mutuamente, al igual que lo hacen durante el desarrollo de retina y a su vez activan la expresión de *dac* que es requerido junto a la vía Hh para la diferenciación de las neuronas de la lámina y para la activación de *sim* (single-minded). Este último, es esencial para la correcta organización de las neuronas en los correspondientes cartuchos o columnas que forman la lámina. Sin embargo, aún no hemos identificado qué determina la expresión de Eya y Six1/2, ya que sus activadores en retina, los genes Pax6, *ey* y *toy* no parecen afectar la expresión de estos dos genes en el desarrollo de la lámina. No obstante, *ey* parece tener un papel importante durante el desarrollo de la médula, pero no así durante la lámina.

En líneas generales, el casete Eya/So/Dac juega un papel muy importante en la determinación y diferenciación de las células precursoras de la lámina, así como lo es para los fotorreceptores de la retina. Del mismo modo, otro gen bien conservado evolutivamente,

Meis, conocido en *Drosophila* como *homothorax* (*hth*), tiene un patrón de expresión en los precursores de la lámina que recuerda a su expresión en la región proliferativa del primordio de ojo de *Drosophila* donde se encuentran las células precursoras de la retina en un estado proliferativo. Así, *hth* se expresa en las células proliferativas del neuroepitelio del OL, el cuál en su lado más lateral produce las células precursoras de la lámina, que ya presentan la expresión de Eya y So. Además, Hth y Eya/So se reprimen mutuamente para controlar la proliferación y diferenciación de los precursores de la lámina, manteniendo así el tamaño de este órgano en crecimiento durante los estadios larvarios.

Con este trabajo hemos puesto de manifiesto las similitudes y diferencias en cuanto a las redes génicas necesarias para el desarrollo de la lámina en el OL en comparación con el desarrollo de la retina. No es de extrañar que encontremos tantas similitudes, pues se trata de dos estructuras íntimamente relacionadas durante el desarrollo y en cierta forma dependientes, teniendo así que sincronizar su diferenciación. Además, en vertebrados tanto los fotorreceptores como las neuronas que procesan la información visual, forman parte de la retina (multiestratificada) y el desarrollo de la retina al completo obedece a la misma red de genes de especificación del ojo.

El Segundo capítulo de la tesis, se centra en el estudio de una única familia génica, Fezf, compuesta por dos genes en vertebrados *Fezf1* y *Fezf2* y en *Drosophila* por un sólo representante *Dfezf*. Se trata de una familia génica altamente conservada y cuyo estudio se ha centrado en el desarrollo de cerebro, revelando su importancia para el desarrollo de las subdivisiones del cerebro rostral. Son muchas las funciones que se les atribuyen a estos genes en el ámbito del desarrollo neuronal en el cerebro, siendo importantes en la diferenciación de diferentes tipos neuronales, como puedan ser las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas.

A pesar de todos los estudios funcionales llevados a cabo para esta familia génica, poco se sabe sobre su papel en el desarrollo del sistema visual de vertebrados. Sin embargo, en la base de datos de ZFIN encontramos que *Fezf2* se expresa en la retina en desarrollo del pez cebra *Danio rerio*.

En este capítulo se muestra la expresión del homólogo del gen *Fezf2* de pez cebra durante el desarrollo de ojo en pollo y ratón, previo clonaje de estos genes. Por primera vez en pollo (*Gallus gallus*), clonamos el gen y mostramos su expresión en la retina en desarrollo. El patrón de expresión de *Fezf2* en retina parece ser consistente entre las diferentes especies y proporciona información sobre su posible función durante el desarrollo de ojo. Recientemente, ha sido demostrado que *Fezf2* es esencial para la correcta diferenciación de las células ganglionares de la retina en ratón (Chunsheng Qu et al., 2016). Con esta comparativa, además de mostrar la expresión de *Fezf2* en la retina en desarrollo de tres especies de vertebrados, representantes de 3 taxa diferentes (mamíferos, teleósteos y aves) frecuentemente utilizados como modelos de estudio del desarrollo de ojo, mostramos algunos datos de interés sobre la expresión de *Fezf2* en el cerebro adulto de ratón. Estos datos, junto con datos funcionales recogidos en la literatura, nos permiten sugerir que *Fezf2* parece tener un papel genérico en cuanto a la diferenciación celular de precursores neuronales, independientemente del tejido neuronal de que se trate, siendo clave para mantener un estado intermedio de los precursores, en el que se inhibe la proliferación y la des-diferenciación y se asegura el paso hacia la diferenciación neuronal.

También centrado en esta familia génica, mostramos en otro apartado de este capítulo, los resultados sobre la expresión del gen *Dfezf* durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, describiendo por primera vez su patrón de expresión. Usando la expresión relativa de *Dfezf* con respecto a los genes *lrx*, demostramos que *Drosophila*, no sólo tiene una estructura tripartita del cerebro, sino que la expresión de los genes anteriormente mencionados es limítrofe. Estos datos junto a la expresión relativa con respecto a otros marcadores de la organización tripartita del cerebro, permiten posicionar en el embrión de *Drosophila* la región homóloga a la *Zona Limitans Intratalamica* (ZLI) de vertebrados. Por tanto, la aparición de la ZLI, uno de los centros organizadores del cerebro de vertebrados, se remonta evolutivamente a un ancestro común entre protóstomos y deuteróstomos. Si bien, ambos genes *Fezf* resultan esenciales en el establecimiento de la ZLI del diencéfalo de vertebrados, y la represión recíproca entre los genes *Fezf* e *lrx* es esencial para la correcta formación de la ZLI, en *Drosophila* no encontramos alteración alguna del patrón de *Dfezf* en mutantes *lrx*, no pudiendo concluir si la función de estos genes está conservada evolutivamente. En este apartado describimos también por primera vez la expresión de *Dfezf* durante el estadio larvario L3 de *Drosophila*.







# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. INTRODUCCIÓN

Un animal o planta pluricelulares son un clon ordenado de células que contienen el mismo genoma pero que presentan especializaciones distintas. En todos los organismos, con la fecundación del huevo, ya se establece una polaridad en el mismo, la cual determina los dos futuros ejes del cuerpo. A partir de este momento las células empiezan a expresar su contenido genético de forma diferente según su posición en el huevo y cuando empiezan a dividirse, van formando una capa embrionaria u otra, dependiendo de esa posición. El establecimiento de las tres capas embrionarias ocurre gracias a un compromiso entre proliferación (y muerte celulares) y especificación, lo que hace que cada capa tenga un número de células con una función. Esto sólo es el comienzo de lo que posteriormente sigue ocurriendo en el desarrollo del organismo para la formación de cada uno de los órganos. Este compromiso es posible gracias a la comunicación intercelular que inhibe o activa determinadas rutas de señalización intracelular que, a su vez, activan o inhiben la expresión de unos u otros genes, siendo muy importante, por tanto, el entorno de cada célula. Además, este compromiso entre ambos procesos, es lo que hace que todas las partes de nuestro organismo tengan un tamaño determinado y estén confinadas a realizar una función específica en el órgano del que forman parte. En qué momento se detiene la proliferación y ocurre el paso del estado proliferativo hacia un estado predeterminado, y que genes y rutas de señalización están implicados, son cuestiones de gran interés científico. Aunque hay muchos avances sobre la genética del desarrollo, desconocemos en gran medida: 1) En que se traduce, molecularmente, la especificación de un tipo celular causada por la expresión de un conjunto de genes selectores, es decir, cuales son los genes realizadores activos e inactivos que describen el estado funcional de un determinado tipo celular; y 2) Cómo se coordinan especificación y crecimiento de órganos (Conlon and Raff, 1999).

Queda mucho por revelar sobre los mecanismos y/o señales que necesita una célula para, en un momento del desarrollo, parar su proliferación y dejar su estado multipotente para comenzar su diferenciación. Conocer estos mecanismos no es solo importante desde el punto de vista evolutivo, sino también desde el punto de vista biomédico. Así los mecanismos genéticos que garantizan la proporcionalidad constante entre los órganos dentro de una especie son, precisamente, los que esperamos que varíen para generar nuevas formas durante la evolución. No obstante, el cáncer se puede considerar una subversión de los mecanismos que controlan el número "adecuado" de células de un tejido dentro de cada organismo (Kenyon et al., 2003). Varios estudios indican que el origen del cáncer se encuentra en las células madre adultas de cada tejido, dada su capacidad proliferativa y multipotente, siendo este tipo de células casi las únicas en reproducir el tumor y, por tanto, responsables de la ineficacia de los tratamientos quirúrgicos, entre otros, para erradicar totalmente un tumor (Donnenberg and Donnenberg, 2005; Simoes and Vivanco, 2011; Reya et al., 2001), resultando además hipotéticamente responsables de la capacidad invasiva del tumor (Li et al., 2007). Por ello, resulta de vital importancia conocer tanto el entorno que mantiene a las células madre como tales, multipotenciales, (rutas de señalización, señales célula-célula...) como aquello que en un momento dado puede llevarlas a diferenciarse, siendo este punto de transición uno de los objetivos que se abordan en este trabajo. Sabiendo que mecanismos controlan estos procesos se podría desarrollar una droga dirigida a esas células madre tumorales (Desplan, 1997; Kenyon et al., 2003) para promover su diferenciación específicamente, evitando así la regeneración del tumor tras un tratamiento quirúrgico. Esto unido al conocimiento de la intrincada trama de señales que conlleva al desarrollo de un órgano, es decir, cada uno de los genes responsables y cómo interactúan entre ellos en cada uno de los pasos del desarrollo de un organismo modelo sería un hallazgo de gran valor para la ciencia, teniendo en cuenta que son los genes (Kenyon et al., 2003) implicados en desarrollo los más conservados a lo largo de la evolución entre especies muy dispares. Por éste motivo, podemos observar grandes similitudes entre los embriones de especies muy lejanas evolutivamente.

## 2. Objetivos

En este trabajo, no sólo se pretende abordar el estudio de los genes que controlan la transición entre un estado celular multipotente y proliferativo hacia un estado celular determinado y quiescente, sino hacerlo desde varios puntos de vista y utilizando diferentes modelos de estudio. Así, esta tesis se subdivide en dos capítulos que abordan esta cuestión de diferente forma. En el primer capítulo, esta cuestión se aborda de la siguiente forma: queremos saber que vías de señalización llevan a las células progenitoras del neuroepitelio (Ne) a convertirse en las células precursoras de la lámina (LPCs) y a éstas, a dar lugar finalmente a las neuronas de la lámina, es decir, cómo pasan de un estado proliferativo (en el Ne) hacia un estado quiescente y determinado (LPCs) para finalmente diferenciarse como neuronas de la lámina. Pero en éste segundo capítulo, abordamos otras cuestiones de tipo evolutivo, no solo interespecífico sino intraespecífico.

En cuanto al sentido evolutivo interespecífico, tenemos que la red de genes que participa en el desarrollo de ojo está muy bien conservada desde invertebrados hasta vertebrados, así el cassette de genes *Pax6/ey-Eya1/eya-Shh/so-Dach1/dac* regula el desarrollo de ojo en numerosos organismos, así como en humanos. Esta red de genes actúa también durante el desarrollo de la retina de *Drosophila*. En la mosca de la fruta la retina sólo consta de fotorreceptores y células accesorias, mientras que las neuronas que procesan la información visual residen en una estructura llamada globo óptico, cuyo primer ganglio en recibir los axones de los fotorreceptores es la lámina. Sin embargo, en vertebrados, la retina está estratificada y contiene las neuronas que procesan y transducen al cerebro toda la información visual, siendo su completo desarrollo regulado por la red génica anteriormente mencionada.

Con esta información, nos hemos planteado el estudio del papel de esta red génica durante el desarrollo de la lámina, como parte del centro que procesa la

información visual en *Drosophila*, puesto que en vertebrados regula el desarrollo de la retina al completo, incluidos fotorreceptores y los distintos tipos de neuronas. Desde el punto de vista intraespecífico, se sabe que hay redes génicas que actúan sobre distintos procesos del desarrollo en distintos tejidos, así la vía Notch, por ejemplo, es responsable de la diferenciación de varios tipos celulares de forma selectiva, tanto fotorreceptores como neuronas del sistema nervioso, etc. (Bray, 2006; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Del mismo modo, el cassette *Pax6/ey-Eya1/eya-Shh/so-Dach1/dac* regula varios procesos, no sólo el desarrollo de retina, ((Ikeda et al., 2002; Zhang et al., 2002, 2006; Li et al., 2003; Bessarab et al., 2004; Purcell et al., 2005; Bumsted-O'Brien et al., 2007; Kaiser et al., 2007; Erickson et al., 2010; Santos et al., 2011) por tanto, resulta interesante averiguar si tiene un papel relevante durante el desarrollo de globo óptico.

En el segundo capítulo, nos centramos en el estudio de un gen que juega un papel muy importante en la transición de un estado celular proliferativo a uno diferenciado. Se trata del gen *earmuff* o *DFezf* en *Drosophila*, el cual está altamente conservado desde invertebrados hasta vertebrados. En estos últimos, se trata de una familia génica de dos genes conocidos como *Fezf1* y *Fezf2*, los cuales resultan de gran relevancia durante el desarrollo del cerebro y el establecimiento de las subdivisiones del mismo.

En *Drosophila* se ha descrito la función de *DFezf* como un gen esencial durante la diferenciación de los neuroblastos de tipo II (Weng et al., 2010a). La función de este gen radica en mantener estos neuroblastos en un estado de transición hasta que están listos para su diferenciación. *DFezf* activa la expresión del gen *prospero* (*Prox1* en vertebrados) haciendo que las células salgan del ciclo celular y mediante su acción antagonista con la vía Notch evita que las células vuelvan a un estado multipotente y proliferativo, es decir evita su desdiferenciación. De hecho, los mutantes para *DFezf* muestran tumores cerebrales (Mo Weng et al., 2010), más concretamente, una expansión de neuroblastos en la región del cerebro. La función de *Dfezf* es, por tanto, muy importante para la correcta diferenciación de este tipo de neuroblastos, y evitar así que las células regresen a un estado en el que proliferen de forma descontrolada, característica principal de las células cancerosas.

Dado su alto nivel de conservación evolutiva y volviendo a la comparativa de los sistemas visuales, resulta intrigante que, a pesar de que la expresión de *Fezf2* ha sido identificada en la retina de pez cebra (Thisse et al, 2005), hasta la fecha no había ningún estudio sobre su posible papel durante el desarrollo de retina en vertebrados, salvo el reciente estudio de Chunsheng Qu y colaboradores sobre la diferenciación de células ganglionares (Qu et al., 2016).

Conociendo su papel en *Drosophila* y dado que *dFez* se expresa también en los globos ópticos, nos preguntamos si *Fezf2* podría tener un papel similar durante el desarrollo de retina en vertebrados, es decir, ejerciendo un control de la transición entre un estado proliferativo y diferenciado de las células de la retina, a través de su efecto sobre *Prox1* y la vía Notch.

Adicionalmente, en esta tesis (Parte 1 del segundo capítulo) se ha llevado a cabo un estudio evolutivo sobre el papel del gen *Fezf* en el establecimiento de la estructura triparita del cerebro. Si bien su papel en el desarrollo de cerebro ha sido profundamente estudiado en vertebrados, resulta de interés saber hasta donde se remonta, evolutivamente, la función de este gen, y por tanto cuán ancestral y común es la disposición de los centros organizadores del cerebro, como es la *Zona Limitans intrathalamica* (ZLI). En esta tesis se ha dado respuesta a esta cuestión como parte de un proyecto de colaboración.

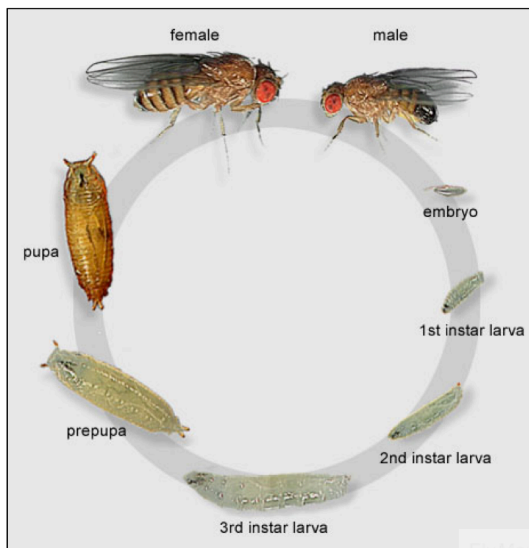
En los dos proyectos, principalmente se ha usado la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, no obstante, también se han utilizado organismos vertebrados como modelo de estudio de retina, principalmente en el pez *Danio Rerio*, el ratón *Mus musculus* y el ave común *Gallus gallus*. A continuación, se detalla una introducción general sobre los organismos modelo utilizados. Una introducción más específica puede leerse al comienzo de cada capítulo.

### **3. ORGANISMO MODELO: *Drosophila melanogaster*. Aspectos generales**

La mayor parte del trabajo de esta tesis se ha centrado en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Ha pasado mucho tiempo desde que se comenzó a

utilizar este organismo modelo para el estudio de la genética del desarrollo, desde comienzos del siglo XX, gracias a Thomas Hunt y su descubrimiento sobre la mutación del gen *white* (Morgan, 1910). Y desde entonces no se ha hecho sino más evidente el conjunto de características ventajosas que hacen de *Drosophila* un fantástico sistema modelo de estudio.

Es fácil y barato mantener un stock y tener cultivos genéticamente diferentes sin ocupar demasiado espacio, además su ciclo vital es relativamente corto. Cuando se cultiva a 25°C sólo se necesitan diez días para completar su desarrollo, desde un huevo fertilizado hasta el estado completamente adulto y fértil. De ésta forma la genética clásica es fácil, puesto que diez días después de un cruce es posible analizar su progenie y usarla para generar otro cruce. El desarrollo de *Drosophila* está dividido en 3 estadios principalmente, embrionario, larvario y de pupación (**Error! Reference source not found.**).



**Figura\_1. Ciclo de vida de *Drosophila*.**

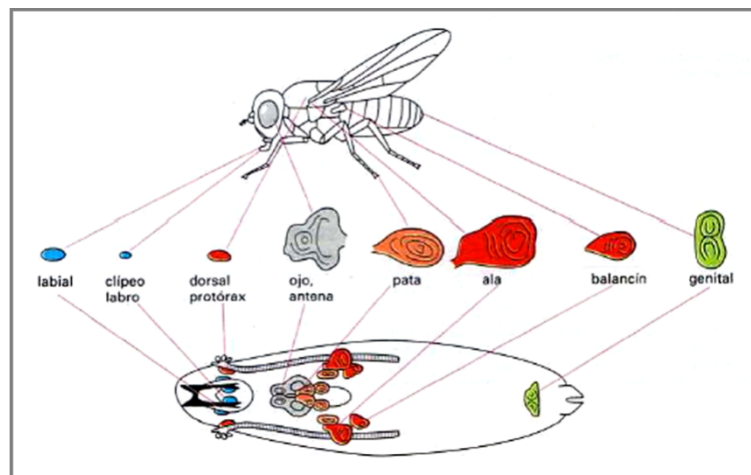
Durante el estadio embrionario, el cual dura aproximadamente 24 horas, es cuando se forman todas las estructuras de la larva, incluido el sistema visual larvario, también conocido como el órgano de Bolwig (OB). A las 24 horas, aproximadamente, la larva de primer estadio eclosiona y comienza a alimentarse inmediatamente. La larva crece mayormente por poliploidización, es decir, que sus células aumentan de

tamaño, y sufre dos mudas separadas entre los tres estadios larvarios: L1-3. El primer estadio larvario (L1) dura unas 24h, durante las cuales la larva se alimenta en la superficie de la comida y durante los estadios larvarios segundo y tercero (que duran 24 horas y 48 horas, respectivamente) la larva sigue alimentándose, pero deja la superficie y se sumerge y escarva en la comida. Hacia el final del tercer estadio larvario cuando deja de alimentarse, la larva deja la comida y busca un lugar apropiado para la pupación. Durante el estadio de pupa,



*Drosophila* sufrirá metamorfosis durante unos 4 o 5 días. Es en este período, cuando la mayoría de los tejidos larvarios comienzan a sufrir histólisis, mientras los discos imaginales, el conjunto de primordios del adulto se fusionarán y sufrirán morfogénesis para dar lugar al adulto o *imago*. Un conjunto particular de estos primordios es originado por invaginación de la epidermis embrionaria formando un pequeño saco plano de células, que posteriormente, darán lugar a la mayoría de la epidermis adulta. Al ser estos, los precursores de las estructuras de la mosca adulta, se denominaron "discos imaginales", de la palabra latina "imago" que significa, adulto.

Hay diferentes tipos de discos imaginales, dependiendo de la estructura en la que se van a desarrollar, y para cada tipo, un par de discos imaginales existe en el embrión, con la excepción del disco genital, que es único (**Error! Reference source not found.**). Cada disco imaginal, formando parte de un par, dará lugar a la mitad de una estructura del adulto. Por ejemplo, la cabeza adulta se desarrolla a partir de un par de discos imaginales ojo-antena, cada uno de los cuales da lugar a un ojo, una antena y a la mitad de la cabeza de la mosca adulta.



**Figura\_ 2. Discos imaginales de la larva.**

La larva sufre tres estadios larvarios, cada uno separado por una muda de la cutícula. Durante estos tres estadios larvarios, las células de los discos imaginales proliferan y se especifican en los diferentes primordios de los órganos adultos. Al comienzo del tercer estadio, los discos imaginales son sacos aplanados

compuestos por células uniformemente cuboidales, pero conforme el desarrollo larvario prosigue, las células de cada lado del saco del disco imaginal adoptarán uno u otra morfología: columnar o escamosa. El lado columnar dará lugar a las estructuras cuticulares adultas y es por tanto llamada Epitelio Principal. El lado escamoso, se llama Epitelio Peripodial (PE) y funciona durante la eversión y fusión de los discos imaginales, aunque algunas estructuras del adulto se forman también a partir de este epitelio (Milner et al., 1983).

Hacia el final de L3, la mayoría de los discos imaginales han sido especificados, crecidos y determinados como precursores de las estructuras adultas. El estadio final del desarrollo es la pupación. Este estadio toma 6 días para ser completado y es cuando los discos imaginales se diferencian y fusionan para dar lugar a la epidermis continua del adulto.

Durante la pupación, la apoptosis juega un papel muy importante, siendo inducida de una forma controlada para ajustar el número total de células de las estructuras adultas y la hormona esteroidea ecdysona es requerida durante esta fase de la metamorfosis (Jiang et al., 1997) (Rusconi et al., 2000) (Bangs and White, 2000).

#### **4. Técnicas genéticas para el estudio de la función génica en *Drosophila***

Una de las ventajas de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, es el amplio repertorio de herramientas disponibles, en cuanto a ingeniería genética se refiere. Una larga lista de líneas transgénicas, producto de la adaptación de mecanismos originalmente de levaduras, permiten la expresión ectópica controlada o la inducción controlada de clones mutantes, y esta estrategia ha sido clave para la realización del estudio aquí presentado. La expresión ectópica, así como la supresión de la expresión de un gen específico son de gran utilidad para determinar si el modo de acción de un gene es autónomo celular o no y la suficiencia de este gen para la especificidad celular. Entre los mecanismos adaptados de levaduras, el principal, es el ampliamente conocido sistema Gal4.

## 4.1 Sistema Gal4-UAS en *Drosophila*

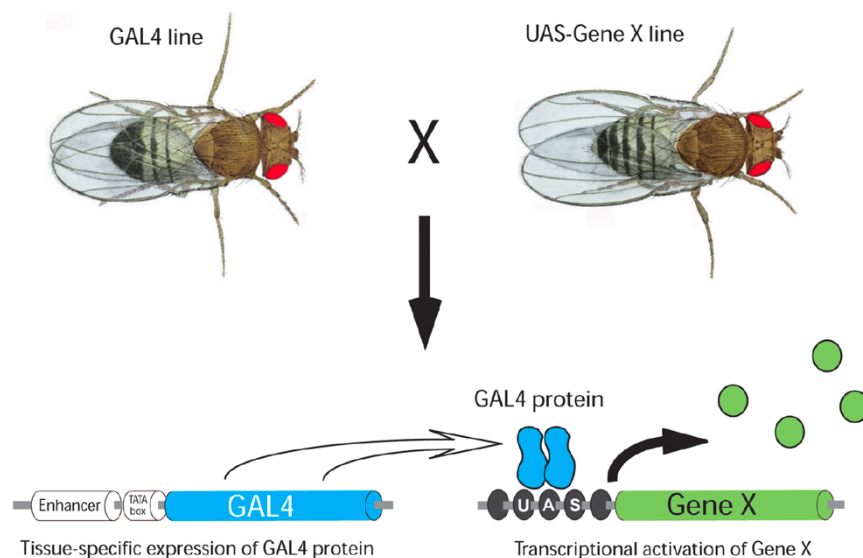
Este sistema consiste en dos componentes esenciales, ambos derivados del sistema para el metabolismo de la galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos componentes son: Gal4, un factor de transcripción, el cual activa los genes responsables de la degradación de galactosa, cuando no hay otra fuente de energía adicional disponible. El otro componente esencial de este sistema es la secuencia activadora conocida como UAS (del inglés upstream activation sequence). A esta secuencia UAS se une el activador Gal4 para dirigir la expresión de los genes aguas abajo de la secuencia UAS, Gal10 y Gal1. Dado el alto nivel de conservación en la maquinaria de transcripción en eucariotas, Gal4 puede activar la transcripción en otras especies, como *Drosophila*, pez-cebra, etc., así como en plantas y células humanas en cultivo (Fischer et al. 1988; Ma et al. 1988; Kakidani and Ptashne 1988; Webster et al. 1988).

Tomando la ventaja de Gal4 como un activador de la transcripción, el sistema Gal4 se desarrolló con el objetivo de expresar genes de interés (Brand and Perrimon, 1993). En su origen el sistema se pretendía utilizar para la expresión de productos letales, de ahí que el activador Gal4 se mantuviera separado del gen diana, precedido de la secuencia UAS, en dos líneas transgénicas diferentes. De este modo, el gen diana se mantiene silenciado hasta que el activador Gal4 es introducido mediante el cruce genético de ambas líneas (Figura\_ 3) (Brand and Perrimon, 1993).

Específicamente el sistema Gal4 funciona del siguiente modo, el factor de transcripción Gal4 se une a una secuencia activadora de 17 nucleótidos, y 5 repeticiones contiguas de esta secuencia activadora es lo que conocemos como secuencia UAS. Así, Gal4 activa de este modo cualquier gen clonado a continuación la secuencia UAS seguida de un promotor mínimo.

Con este sistema, un promotor de interés cualesquiera, puede ser clonado para dirigir la expresión de Gal4 en un patrón similar al del gen endógeno, dirigiendo así la expresión del gen diana de interés en el mismo patrón espacio-temporal que el gen cuyo promotor haya sido utilizado. Un ejemplo en este trabajo es el uso del promotor del gen *hedheog* (*hh*) (*hh>Gal4*) para dirigir la

expresión del marcador GFP (UAS-GFP), recapitulando GFP la expresión del gen *hh* (Figura 19A). También la detección de regiones reguladoras *enhancer* ha sido utilizada para generar un gran número de líneas Gal4 con diferentes patrones de expresión ((O’Kane and Gehring 1987; Hrdlicka L et al., 2002; Manseau L et al., 1997; Brand and Perrimon, 1993). En este caso, un gen Gal4 con un promotor mínimo es introducido en el genoma por transposición de un elemento-P. Dependiendo del sitio de integración, la expresión de Gal4 será dirigida por uno o un set de varios *enhancers*. Estas líneas son conocidas bajo el nombre de “enhancer traps” y es la misma técnica utilizada para la generación de líneas de marcadores mediante la introducción del gen de la B-Galactosidasa, un método colorimétrico que permite la visualización del patrón de expresión que dirige el “*enhancer* atrapado” mediante la tinción específica del producto de la reacción catalizada por el enzima B-galactosidasa, Lac-Z. Muchas han sido las líneas Gal4 generadas y analizadas por este método, creando un amplio abanico de combinaciones para la expresión de cualquier gen de interés precedido por la secuencia UAS. En este trabajo hemos usado, por ejemplo, la línea c855a>Gal4, en cuyo caso obedece a una región reguladora que se activa en los centros proliferativos de los GOs (Egger et al., 2007). Y gracias la versatilidad del sistema, también se utilizó la misma línea c855a>Gal4 para dirigir la expresión de los genes *teashirt* (UAS-tsh)(Figura 9) y *Axin* (UAS-Axin) (Figura 32), así como del marcador GFP (UAS-GFP) (Figura 31).



**Figura\_ 3. Expresión ectópica de un gen dirigido mediante el sistema Gal4-UAS.** El gen Gal4, que codifica para un activador transcripcional de levaduras, es introducido en el genoma de *Drosophila* bajo el control de un promotor endógeno específico o como parte de un vector para la detección de un *enhancer*. Así, las líneas que expresan la proteína Gal4 en un tejido específico se cruzan con líneas que llevan el gen diana de interés (gen X), subclonado a continuación de 5 regiones de unión para Gal4 (secuencia UAS). El gen diana es expresado en la progenie, que resulta del cruce de ambas líneas, sólo en aquellas células y tejidos donde Gal4 esté presente (Brand & Perrimon, 1993). Figura adaptada de Tony D. Southall et al., 2008.

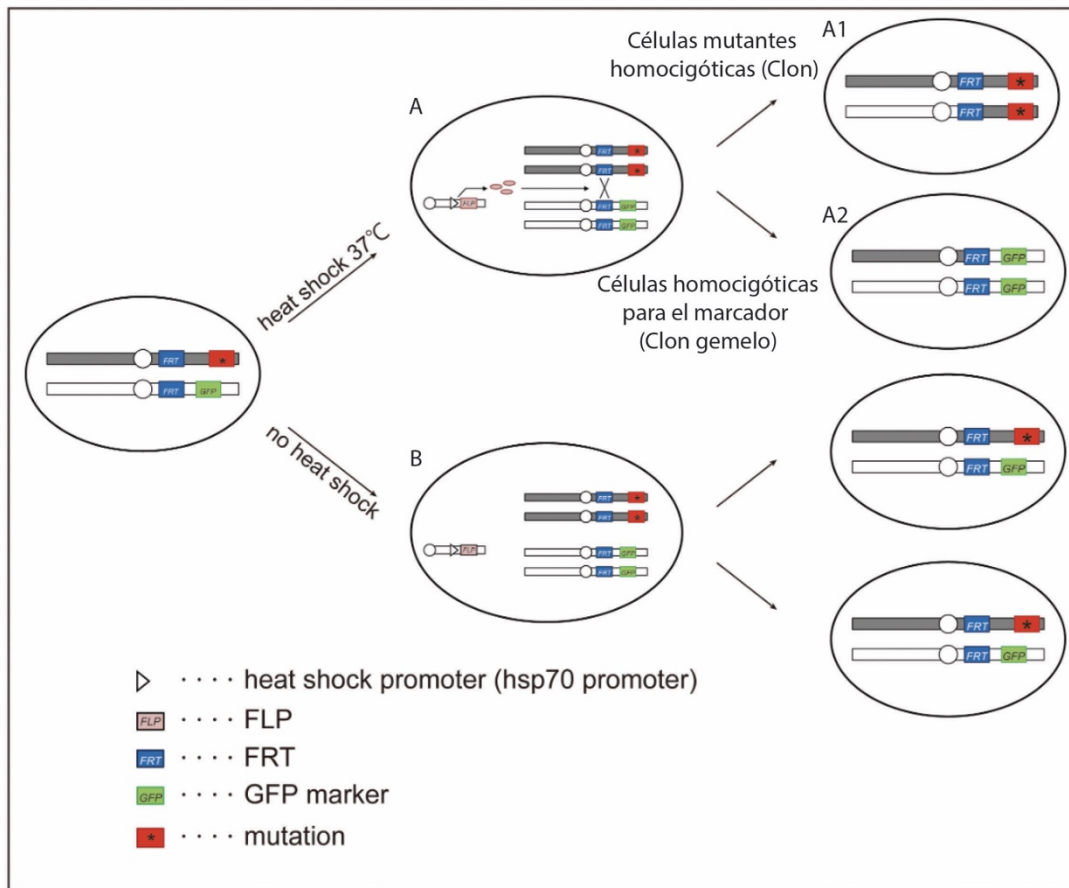
#### **4.2 Sistema Gal4 activado por un promotor inducible por choque térmico (*heat-shock*).**

Uno de los sistemas utilizados para controlar la expresión de Gal4, es el uso del promotor *heat-shock* para dirigir la expresión de Gal4 (Brand et al. 1994). Este promotor sólo se activa a 37°C y tras devolver el cultivo a su temperatura habitual de 25°C (29°C si se quiere potenciar el efecto de expresión de Gal4) el promotor queda desactivado pero el Gal4 producido puede efectuar su trabajo. Con este sistema se puede controlar convenientemente tanto el momento de la expresión como los niveles de expresión, ajustando el tiempo y la temperatura a la que el *heat-shock* es dado.

#### **4.3 Generación de clones. El sistema FRT/FLP.**

Otro sistema de levaduras que ha sido adaptado a *Drosophila* como herramienta genética es el sistema FRT/FLP (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993). El sistema de la recombinasa FLP promueve la recombinación en *cis* de dos secuencias FRT (del inglés Flip recognition target) en el mismo *locus*, induciendo una alta frecuencia de eventos de recombinación homóloga. Este sistema permite la generación de clones de células con un genotipo determinado rodeados de tejido normal. Este sistema ha permitido analizar la función de muchos genes mediante la inducción de clones de falta de función, en casos en los que la mutación causa letalidad embrionaria en homocigosis, permitiendo así el análisis del fenotipo en cualquier estadio del desarrollo.

Este sería el caso típico de clones de pérdida de función, en los que las células parentales son heterocigóticas para una mutación dada. Uno de los alelos que



**Figura\_ 4. Clones FRT-FLP.** La recombinasa FLP de levaduras es capaz de generar recombinación entre cromosomas homólogos que llevan la secuencia FRT en el mismo locus. En el caso de la figura, la FLP se expresa bajo un promotor inducible por *heat-shock* y sólo cuando el choque térmico es aplicado la FLP puede inducir la recombinación entre secuencias FRT (A). Las células son inicialmente heterocigóticas en *trans* para el gen marcador y la mutación. Tras mitosis, dos de las cuatro posibles combinaciones resultantes dan lugar a una célula hija que hereda la mutación en homocigosis, perdiendo el gen marcador (A1). La célula hija hermana, por el contrario, hereda dos copias del alelo silvestre además de las dos copias del gen marcador (A2). En consecuencia, se obtienen dos clones, el clon mutante (con ausencia del marcador) y el clon gemelo silvestre, con dos copias del marcador. Imagen obtenida de <http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t200> y modificada.

contiene la secuencia FRT es el mutante, mientras que el otro alelo que es el silvestre tiene próximo a la secuencia FRT un gen marcador, como pueda ser GFP y al otro lado de la secuencia FRT se encuentra un promotor ubícuo que dirige la expresión del marcador. De esta manera, cuando la flipasa es inducida en un grupo de células, por ejemplo, mediante *heat-shock*, en estas células pueden recombinar sus cromosomas entre dos secuencias FRT presentes en la misma

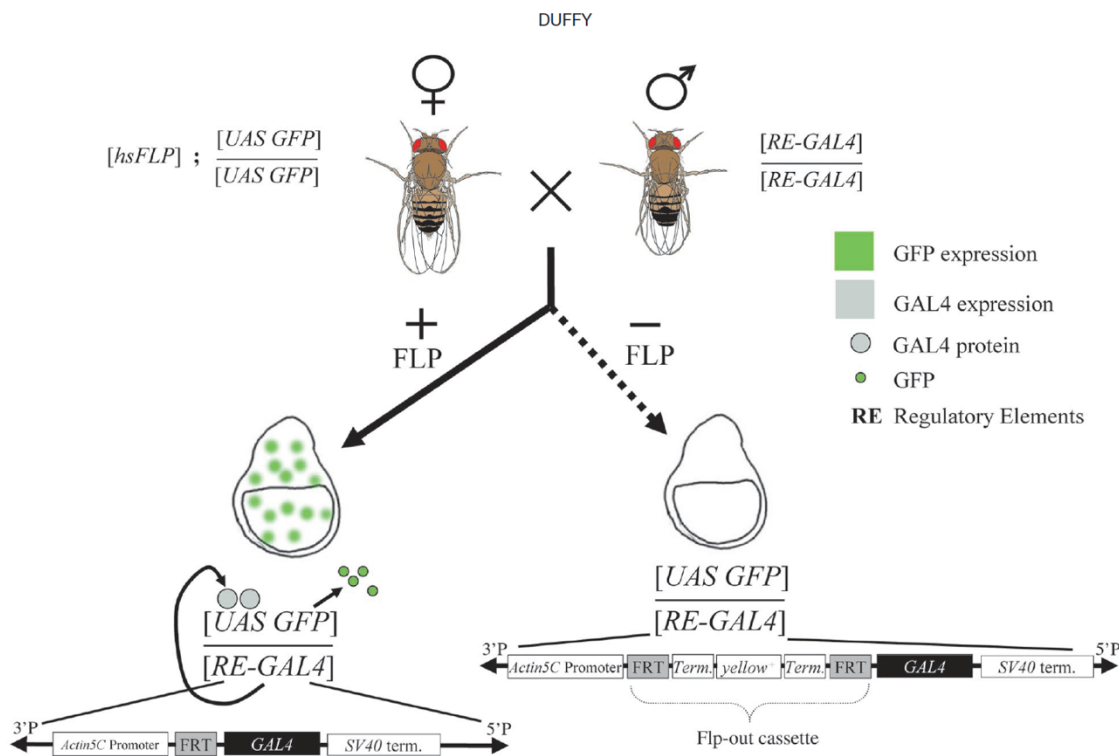
localización en cromosomas homólogos. Así, las secuencias FRT inducen la recombinación homóloga, obteniendo células hijas en las que ambos alelos son mutantes y el mismo porcentaje de células con los dos alelos silvestres. Las células homocigóticas mutantes pierden el marcador (GFP), siendo fácilmente reconocibles porque son las únicas no teñidas (ver esquema en Figura\_4). El clon gemelo del clon mutante tiene el doble de marcador que las células heterocigóticas vecinas, un claro ejemplo de este efecto son los clones de la

figura 16, en los que las células con dos copias del marcador presentan claramente una señal de fluorescencia más fuerte que el tejido circundante. Ejemplos de clones de pérdida de función en este trabajo pueden ser observados en las figuras 26C, 22B-C (*dac<sup>-/-</sup>*), figuras 21A-B, 22A (*smo<sup>-/-</sup>*) y 16A (*eya<sup>E8</sup>*).

#### **4.4 Clones FLP-OUT. Combinación de sistemas Gal4-UAS y FRT-FLP.**

En el caso anterior hemos descrito un sistema de recombinación homóloga en el que las secuencias FRT que recombinan se encuentran en *trans* en la misma localización, pero en cromosomas homólogos. Hay otra posibilidad que consiste en que ambas secuencias FRT se encuentren en *cis* en el mismo cromosoma. En este caso, la recombinasa FLP media la recombinación entre las dos secuencias FRT excluyendo el fragmento de ADN que se encontraba entre ambos sitios FRT (llamado casete). Es lo que se conoce como un FLP-OUT de ADN (Struhl and Basler, 1993). La expresión de la flipasa es aquí también frecuentemente dirigida por un promotor heat-shock. FLP-OUT es un sistema para generar clones de expresión ectópica en el que se combina la técnica mencionada con el sistema Gal4-UAS. Básicamente las secuencias FRT, en este caso, flanquean un fragmento de ADN que contiene un terminador de la transcripción, mientras que precediendo la primera secuencia FRT se coloca un promotor ubicuo. Tras el segundo FRT se coloca la secuencia que codifica para el gen activador Gal4. De esta forma el casete entre las secuencias FRT separa el gen Gal4 de su promotor y mediante el terminador impide la transcripción. Sólo cuando el casete es eliminado por recombinación inducida por la flipasa, la transcripción de Gal4

tiene lugar y el activador puede unirse a las secuencias UAS presentes para activar la transcripción de cualquier gen que la contenga.



**Figura\_ 5. Sistema FLP-FRT combinado con el sistema de inducción Gal4.** En esta combinación, la presencia de un casete FLP-OUT impide que el promotor Act5C active la transcripción del gen Gal4. Al inducir la expresión de la recombinasa (FLP) mediante heat-shock, el casete FLP-OUT es escindido. El resultado es la juxtaposición del promotor Act5C y el gen Gal4, induciendo la transcripción de Gal4 y subsecuentemente la expresión del transgen UAS-GFP, sólo en células en las que el casete FLP-OUT ha sido excindido (puntos verdes). Figura de Duffy, 2002.

En ocasiones, un marcador para el reconocimiento de la línea transgénica en la mosca adulta puede ser añadido entre las secuencias FRT, como por ejemplo *yellow+*, que usado en un fondo *yellow<sup>-/-</sup>*, no sólo ayuda a seguir el transgen en la mosca adulta, recuperando ésta el color amarillo de la cutícula, sino que es posible analizar fenotipos adultos como las quetas de la cutícula porque los clones pueden identificarse por la ausencia de pigmentación amarilla (Figura\_ 5).

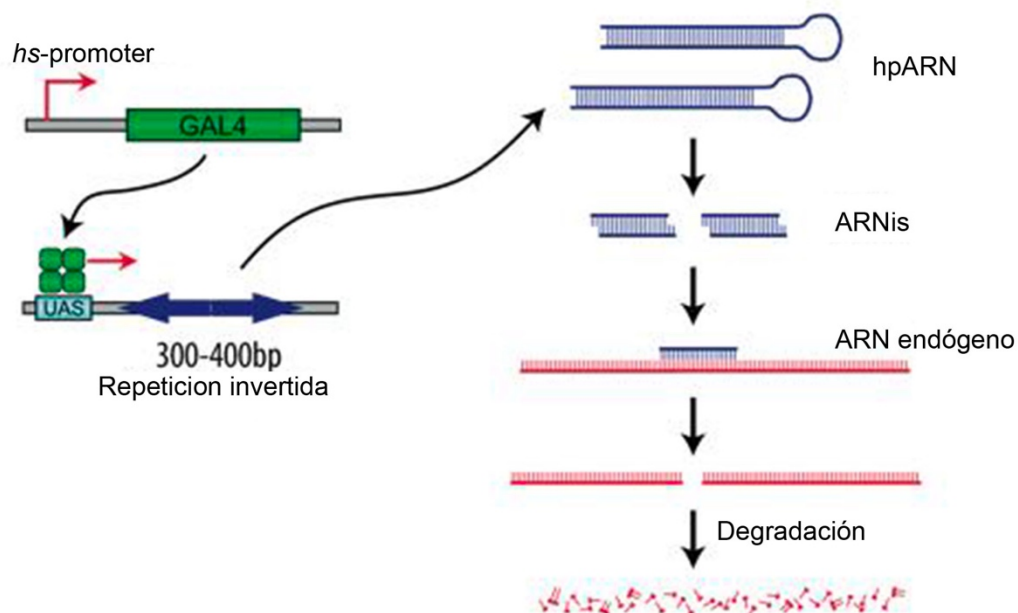
El sistema FLP-OUT se puede utilizar para generar clones de expresión ectópica, como los clones de la figura 31, las figuras 22D, 23 y 26D-E, y la figura 18B, *tkv<sup>QD</sup>*,



*hth* y *dac*, y *hth*-GFP, respectivamente. Pero, también este sistema puede ser utilizado para silenciar o disminuir la expresión de un gen, generando los llamados clones *knockdown*.

En este caso Gal4 dirige la expresión de un ARN de interferencia (ARNi) específico para un gen cuando es precedida de una secuencia UAS. Este ARNi consiste en la expresión de una hebra de ARN de unas 300-400bp con una repetición invertida de la secuencia, que tras su síntesis origina una conformación en horquilla (hpARN). La larga doble hebra de ARN formada al hibridar sobre sí misma, es procesada por el sistema DICER en pequeñas moléculas de ARN de interferencia (ARNi) de 21-23bp que consecuentemente dirigen la degradación específica del ARNm diana por el complejo silenciador de ARNm (RISC) (Figura\_ 6) (Ver revisión de Kavi HH et al., 2005).

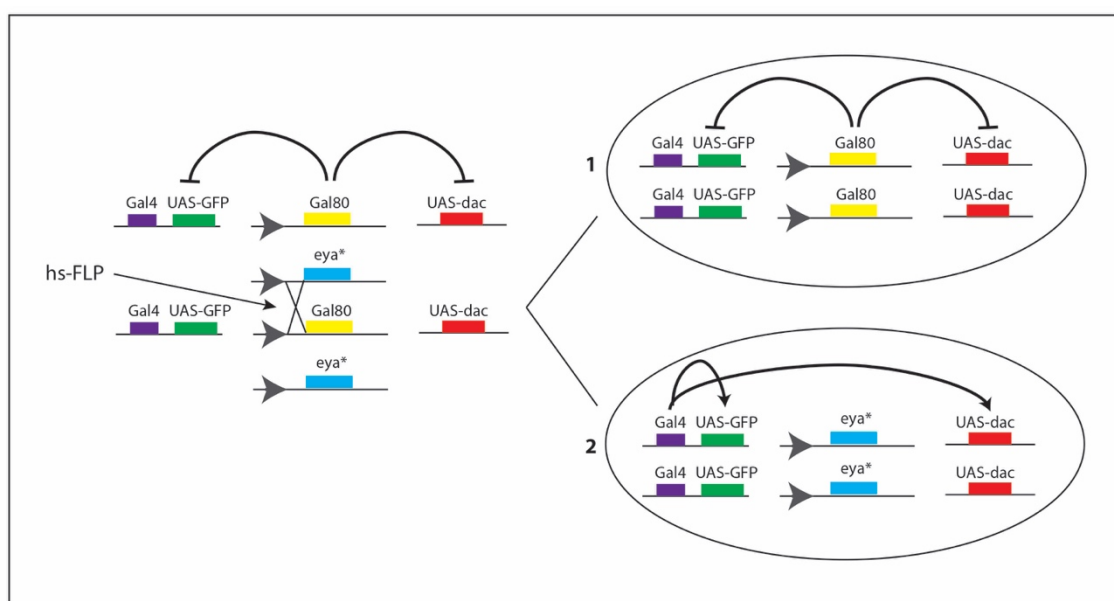
En este caso también se puede añadir al genoma de la línea UAS-ARNi en cuestión, una secuencia UAS-GFP para marcar los clones *knockdown* en fluorescencia. Este sistema se ha utilizado en este trabajo para generar clones *knockdown* para los genes *eya* (Figuras 11A y 16E), *so* (Figuras 11B, 16B y 26A), *hth* (Figura 16D) y *so+hth* (Figuras 16C y 26B).



**Figura\_ 6. ARNi transgénico en Drosophila.** El sistema genérico Gal4-UAS es utilizado para dirigir la expresión de una horquilla de ARN (hpARN). Estas dobles cadenas de ARN son procesadas por Dicer en ARNis, los cuales dirigen la degradación específica de secuencia del ARNm de interés.

#### 4.5 Clones MARCM. Inhibidor Gal80.

El sistema MARCM (del inglés Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) (Lee & Luo, 1999; Lee & Treisman, 2001) es otra técnica en la cual se combinan los sistemas FRT-FLP y Gal4-UAS con el uso del represor de Gal4, Gal80. Este método permite generar clones que simultáneamente presentan pérdida de función para un gen y ganancia de función para otro gen (Figura\_7). En este trabajo se utilizó la técnica MARCM para la inducción de clones de pérdida de función para *eya* que al mismo tiempo expresan ectópicamente *dac* (Ver figura 24).



**Figura\_ 7. Clones MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker).** En este Sistema la recombinación se utiliza para generar clones de células que son mutantes homocigotos para la expresión del represor Gal80 (1) u homocigóticos para un gen (2), ambos en un fondo Gal4. En la condición en homocigosis para Gal80, la función de Gal4 es reprimida por Gal80 y por tanto los genes bajo la influencia de una secuencia UAS no son expresados. Cuando las células son homocigóticas para la mutación (*eya\**), pierden el represor Gal80 y en estas células Gal4 puede activar la expresión de los genes aguas abajo de la secuencia UAS, como son en este caso *dac* y GFP. De este modo se obtienen clones de células con pérdida de función para *eya*, al mismo tiempo que expresan ectópicamente el gen *dac*. Las células de este clon son fácilmente reconocibles por la expresión del marcador GFP.

#### 4.6 Líneas reporteras

El objetivo de las líneas reporteras es poder descifrar en el espacio y el tiempo cuándo un gen en particular es expresado, es decir, reproducir su patrón de

expresión, obedeciendo a la región o regiones enhancer que controlan su expresión. Para detectar este patrón mediante técnicas de inmunohistoquímica es necesario (a menos que se cuente con un anticuerpo específico) contar con un gen marcador, es decir, un gen que codifique para un enzima que catalice la conversión de un determinado sustrato en un producto coloreado que sea detectable visiblemente mediante microscopía óptica. El enzima que ha venido utilizándose desde hace unas décadas es la  $\beta$ -galactosidasa, codificada por el gen Lac-Z de *E. Coli*. Para que este marcador reproduzca el patrón de expresión de un gen X, la secuencia del gen Lac-Z debe de ser introducida en el genoma mediante manipulación genética de forma que su secuencia se integre en el genoma aguas debajo de la región "enhancer" del gen X. Es por esto que esta técnica recibe el nombre de "trampa de enhancers" (O'Kane and Gehring, 1987). Para introducir el gen Lac-Z en cuestión se utiliza un elemento P modificado que contiene el gen reportero bajo un promotor mínimo (O'Kane and Gehring, 1987; Wilson et al., 1989). Este elemento P o trasposón puede ser movilizado dentro del genoma y su integración es al azar (aunque existen sitios de integración preferentes para los trasposones, llamados "hotspots"), de forma que la creación de líneas reporteras debe realizarse a la inversa. En un principio se generan un número de líneas transgénicas que contienen elementos P conteniendo el gen Lac-Z inserto en locus aleatorios. Luego estas líneas se someten a un cribado para seleccionar aquellas con un patrón de expresión de lac-Z que resulte interesante o simplemente se documenta su expresión. La línea elegida se mapea para averiguar el lugar de inserción y ver que regiones enhancer se encuentran próximas y a qué gen o genes pueden corresponder.

En este trabajo se han utilizado diversas líneas enhancer, como *ey-lacZ* (figura 6), *dac-lacZ* (Figura 11), *3EE-lacZ* (región específica del enhancer de *dac*, figura 15), *ptc-lacZ* (figura 19), *dpp-lacZ* (figura 26), y *tkv-lacZ* (figura 28).

Hay que tener en cuenta que un gen puede ser regulado por una o varias regiones enhancer, y la acción y combinación puede dar diferentes patrones de expresión dependiendo del tejido y del estadio del desarrollo. Por lo tanto, dependiendo el lugar de inserción del elemento P (*lac-Z*) podemos obtener el patrón de expresión completo para un gen dado o sólo de forma parcial. Este

parece ser el caso de la línea ey-lacZ utilizada en este trabajo, que aún reproduciendo bien la expresión de eyeless en el primordio de ojo, no es capaz de reproducir su expresión en el globo óptico, que probablemente responda a una región "enhancer" diferente. Es importante, tener en cuenta esta limitación cuando se realice la caracterización de un nuevo gen, en el que los resultados negativos de expresión deben someterse a un estudio más exhaustivo.

Una alternativa a este sistema es que la secuencia introducida, en lugar de codificar para el gen lac-Z, codifique para una proteína fluorescente como GFP (Morin et al., 2001).

## ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA VISUAL DE DROSOPHILA

### 5. Desarrollo del sistema visual durante embriogénesis

La organización del sistema visual de la mosca es extraordinario, tanto por su precisión, como por su complejidad. Este sistema visual en el adulto de *Drosophila* se compone de dos ojos compuestos y por otro lado de 3 órganos fotosensibles que sirven para la orientación durante el vuelo, llamados ocelos y que se encuentran en la región superior de la cabeza con una disposición triangular. El ojo compuesto es un conjunto regular de aproximadamente 800 unidades idénticas, llamadas ommatidios, empaquetados en una red cuasi-cristalina. Cada ommatidio, de forma hexagonal, está compuesto de un cartucho de ocho neuronas fotorreceptoras únicas y varias células accesorias (conos, células pigmentarias...) las cuales se disponen concéntricamente alrededor del conjunto de fotorreceptores. Los axones de los fotorreceptores se proyectan en un orden topográfico preciso en los neuropilos de los globos ópticos (OL) del cerebro para formar el preciso mapa retinotópico (Douglas and Strausfeld, 2003; Melnattur and Lee, 2011; Niéric and Desplan, 2016; Morante and Desplan, 2004). Los dos globos ópticos son una parte también esencial del sistema visual, pues son los encargados de procesar la información recogida por los fotorreceptores de los ojos compuestos (Tang and Guo 2001; Rister et al. 2007; Gao et al. 2008; Katsov and Clandinin 2008; Yamaguchi et al. 2008). Es por ello, que cada globo óptico en el adulto se encuentra subyacente a la retina y en estrecho contacto con el hemisferio cerebral al cual transmite la información visual (Morante and Desplan, 2004).

Tanto el ojo compuesto adulto, como el ojo de la larva (órgano de Bolwig), así como el globo óptico se originan los 3 de una pequeña región del ectodermo dorsolateral de la cabeza del embrión, llamada "región visual" (Conlon and Raff, 1999; Green et al., 1993) y está definida por la expresión del gen temprano de ojo, *sine oculis* (*so*) (familia SIX en vertebrados), de hecho los mutantes para este gen tienen problemas para la correcta invaginación del primordio de globo óptico (OP) desde el ectodermo (Cheyette et al., 1994a; Daniel et al., 1999). La expresión

de *so* desaparece gradualmente conforme tiene lugar la morfogénesis de la región visual. Esta regulación negativa de *so* sigue un gradiente temporal, en el que células localizadas más anteriores y dorsales pierden antes la expresión de este gen que las células más posteriores y laterales (Cheyette et al., 1994a; Daniel et al., 1999). Hacia la mitad del estadio embrionario, sólo el primordio del ojo de la larva mantiene la expresión de *so*.

Es también, hacia la mitad del desarrollo embrionario, en el estadio 12-13 (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985) cuando la parte posterior de esta región, formada por unas 30-40 células y conocida como el primordio de globo óptico (OP) se invagina y se fusiona con el cerebro en desarrollo, quedando cada OP unido a uno de los primordios de los hemisferios cerebrales. Aunque la mayoría del OP da lugar a los globos ópticos adultos, un pequeño grupo de células dentro del OP forma el ojo de la larva (órgano de Bolwig) durante la embriogénesis. Se conoce que el destino de las células que van a formar parte del órgano de Bolwig versus las que formarán los OL se decide por la expresión de los genes *taillies* y *atonal* que parecen actuar de una manera antagónica, así, mientras las células que expresan *taillies* se diferencian en OL, aquellas que se diferenciarán para formar el órgano de Bolwig expresan *atonal*. La alteración de la expresión de cualquiera de estos genes puede cambiar el destino de las células del OP para formar uno u otro órgano ((Cheyette et al., 1994a; Daniel et al., 1999)).

El sistema visual adulto está compuesto por los ojos compuestos y los ocelos, ambos situados en la cabeza. A diferencia del BO, este set de órganos visuales se diferencia durante los estadios tardíos de la vida de la larva, abarcando parte del comienzo de la pupación. Ambas estructuras se originan a partir de los discos imaginales de ojo-antena (EAD), los cuales aparecen como dos evaginaciones de la involución de la cabeza en el embrión tardío, formadas a partir de la región anterior que flanquea el OP, que se desarrollan durante los subsiguientes estadios larvarios (Chen, 1929; Desplan, 1997). La región del ectodermo dorsoventral que originará el primordio del EAD se caracteriza por la temprana expresión del gen *eyeless* (*ey*) (*Pax6* en vertebrados) hacia el estadio embrionario 8 y más visiblemente durante los estadios 10-12 y posteriormente en el primordio del EAD, permaneciendo durante los estadios larvarios hasta el comienzo del proceso de

diferenciación del EAD (estadio 3). Durante el primer estadio larvario las células tanto del OP como del EAD proliferan. La diferenciación neuronal comienza durante la última parte del tercer estadio larvario.

## **6. Desarrollo del primordio de ojo compuesto**

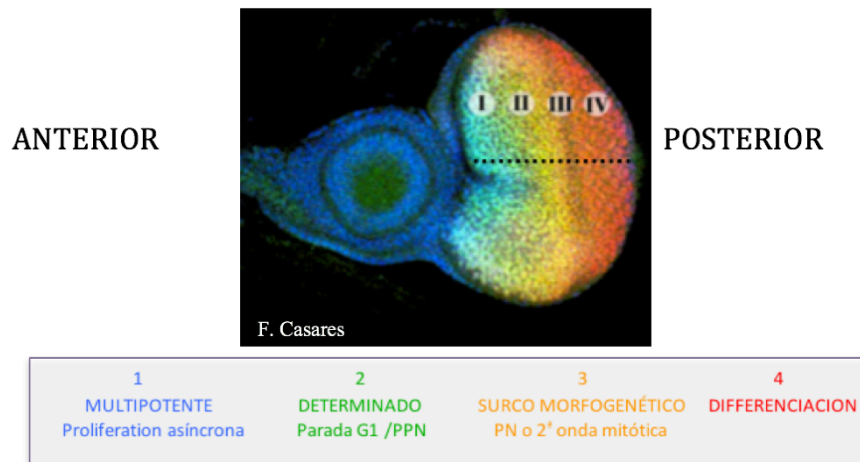
El desarrollo del ojo de *Drosophila* constituye un sistema experimental excepcional donde estudiar los procesos de especificación, determinación y diferenciación celulares (Domínguez and Casares, 2005a). Aunque tres pares de discos imaginales – clypeolabro, labro, y ojo-antena – contribuyen a formar la cabeza adulta, la mayoría de la cápsula cefálica y la mayor parte de los órganos sensoriales, como antenas, palpos maxilares y ocelos, derivan de los complejos de discos ojo-antena (EADCs). Los dos discos ojo-antena se originan de diferentes segmentos embrionarios (segmentos antenal, maxilar, y posiblemente mandibular, intercalar y labial) además del acron que no es un segmento (Casares). El disco imaginal de ojo es un saco epitelial plano que crece y se diferencia durante los tres estadios larvarios (L1-3) y la fase pupal temprana en dos estructuras claramente distintas: el ojo adulto y la cápsula cefálica. Hacia el final de la embriogénesis, los discos se invaginan desde la bolsa dorsal del embrión como dos pequeños sacos epiteliales deshinchados, de aproximadamente 70 células, cada uno. Durante el estadio larvario L1, el EADC es un saco epitelial de unas 30 células y está caracterizado por la expresión de dos genes *Pax6*, *ey* y *toy*, los cuales actúan como genes selectores. El epitelio en este estadio es monocapa y las células son morfológicamente similares. Hacia L2, el EADC se constriñe formando dos lóbulos: el anterior es el disco antena y el posterior el disco de ojo. En este momento, la expresión del gen *cut* caracteriza el disco antenal, mientras que la expresión de *ey* se restringe a la parte del disco de ojo (Kenyon et al., 2003).

Esta diferencia de expresión y la distinción entre el disco antenal y el disco de ojo es seguida adicionalmente por cambios genéticos y morfológicos en las células. Una de las dos capas del saco epitelial se engrosa y sus células se vuelven columnares, mientras las otras células son aplanadas y se vuelven escamosas. Las

células columnares formarán el Disco Principal (DP), y se convertirán en las estructuras adultas (incluidos la antena y el ojo), mientras las células escamosas que forman el Epitelio Peripodial (EP), solo darán lugar a una pequeña región de la cabeza alrededor del ojo (Haynie and Bryant, 1986). En la capa de células columnares es donde se inicia la expresión de una serie de factores nucleares, que incluyen a Eya, So y Dac (Kenyon et al., 2003a). Estos factores, que son denominados colectivamente “genes tempranos de la retina”, interaccionan genética y físicamente entre ellos y con Ey, y su co-expresión “fija” el destino del primordio como ojo (Desplan, 1997). La función de los homólogos de estos genes (Pax6, Eya, Six3, Dach), como sus interacciones, están parcialmente conservadas durante el desarrollo del ojo y la placoda olfativa en vertebrados (Donner and Maas, 2004) (Ver el apartado de desarrollo de ojo de vertebrados). Otros factores de transcripción que se expresan en el primordio del ojo temprano de *Drosophila* son homothorax (hth) y teashirt (tsh). La co-expresión de hth y tsh es esencial para el mantenimiento del estado multipotente y proliferativo del primordio del ojo (Bessa et al., 2002a; Lopes and Casares, 2010a). Durante L3 las células del EP se aproximan al DP adoptando una morfología cuboidal, para dar lugar a la cápsula cefálica (Haynie and Bryant, 1986), y en el margen posterior del disco del ojo, se especializan como el centro de señalización que disparara la diferenciación retinal al comienzo de L3 (Treisman and Heberlein, 1998). Este es un proceso progresivo que se inicia en el polo posterior del primordio y avanza en dirección anterior. El frente de esta onda de diferenciación está marcado por una indentación en el epitelio denominada surco morfogénético (“morphogenetic furrow”: MF). Dos señales intercelulares juegan un papel esencial en el inicio y propagación de la onda de diferenciación: *hedgehog* (hh) y *decapentaplegic* (dpp), un miembro de la familia BMP-4 (revisado en (Treisman and Heberlein, 1998)) (ver figura 27). Por un lado, Dpp reprime a larga distancia la expresión de hth, permitiendo la expresión axial de genes pre-proneurales (Bessa et al., 2002a) por otro, Hh induce la expresión a corta distancia del gen proneural *atonal* (Baonza and Freeman, 2005) que es el primer paso hacia la diferenciación de las células de la retina. Durante su diferenciación progresiva, las células en el primordio del ojo de *Drosophila* atraviesan una serie de estados, desde el



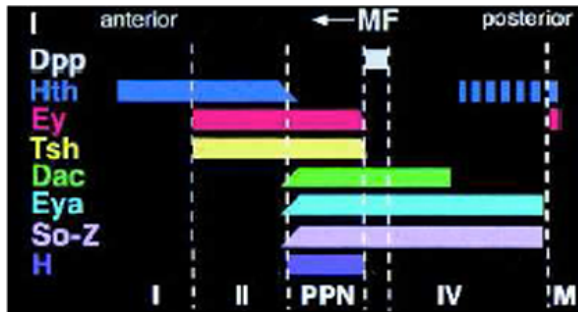
multipotente, hasta el diferenciado, en los distintos tipos celulares de la retina (Figura\_8).



**Figura\_ 8.** La **diferenciación progresiva del primordio de ojo** se produce mediante una sucesión de estados diferenciativos, (1-4) caracterizados por la expresión e interacción de un número limitado de genes. (PPN): pre-proneural; (PN): proneural. En el dominio 3 las células optan por entrar directamente en G0 y diferenciar como fotorreceptores o experimentar una segunda onda mitótica. En el dominio 4 se produce la diferenciación de las restantes células fotorreceptoras y accesorias. La flecha marcada con (t) bajo el esquema del primordio del ojo indica la dirección temporal del proceso de diferenciación.

Cada uno de estos estados está caracterizado por una combinación específica de factores de transcripción y proteínas nucleares, entre los que se encuentran los codificados por los genes *toy*, *ey*, *eya*, *so*, *dac*, *eyg*, *tsh*, *optix*, *hth* y *exd* (Bessa et al., 2002a)(Domínguez and Casares, 2005a; Pappu and Mardon, 2004) (ver **Figura\_ 9**). Las células que yacen anteriores al MF son indiferenciadas, aunque están especificadas genéricamente como "ojo" por la expresión de los dos genes selectores de ojo Pax6: *ey* y *toy*. Dentro de esta población se distinguen dos subdominios: el más anterior contiene células mantenidas multipotentes y proliferativas por la expresión del factor de transcripción *Hth* (Estado 1; (Bessa et al., 2002a)). En el otro subdominio, adyacente al MF, las células pierden la expresión de *hth*, paran su ciclo celular en G1 y expresan un conjunto específico de genes. Este dominio determinado (Estado 2) se denomina pre-proneural, ya que precede a la diferenciación de las células. Esta diferenciación se inicia en el MF (Estado 3) y continúa posterior a este (Estado 4).

Estas transiciones están perfectamente orquestadas mediante vías de señalización intercelulares ((Domínguez and Casares, 2005a; Pappu and Mardon, 2004); Ver Figura\_8).



Figura\_9. Muestra la localización de la expresión de cada gen en el desarrollo del primordio de ojo, en cada subpoblación celular. Imagen de Bessa et al., 2002.

## 7. Genes específicos durante el desarrollo temprano de la retina (RDG) en *Drosophila*

Como se describe anteriormente el desarrollo temprano de la retina de *Drosophila* obedece a un grupo de genes altamente conservados. Comenzando con el llamado, "gen selector de ojo" Pax6 (Gehring, 2002), cuyos ortólogos en *Drosophila* son *eyeless* (*ey*) y *twin of eyeless* (*toy*), estos genes gobiernan el comienzo de una cascada de señalización que especifica el territorio del ojo y son los responsables de la activación de los genes *so/Six* y *eya/Eya* (Figura 3, Introducción Capítulo 1). Para asegurar el momento correcto de la activación de estos genes, *homothorax* (*hth*) otro gen altamente conservado (Meis y Prep en vertebrados) y que se expresa en el dominio proliferativo y progenitor (estado1, Figura\_8) del primordio de ojo como consecuencia de la vía de señalización de *wg*, inhibe la expresión de *eya/so*. Esto asegura el número adecuado de células en el primordio de ojo antes de comenzar su diferenciación. Por su parte, *eya* y *so*, son activados en el estado 2 por la vía de señalización de *Dpp* y median la activación de *dachshund* (*dac*), induciendo el proceso de diferenciación (Bessa et al., 2002; Chen et al., 1999; Curtiss y Mlodzik, 2000). Juntos, *eya/so/dac* forman el casete de los genes de diferenciación de la retina. A continuación, se describen en detalle cada uno de estos genes.

### **7.1 ey/toy/Pax6**

Los genes *ey* y *toy* codifican para factores de transcripción con dos dominios característicos de unión a ADN, el dominio "Paired" (PD) y el "Homeodominio" (HD) (Quiring et al., 1994). Como ya se ha comentado anteriormente estos genes son los primeros responsables para la especificación de la retina en *Drosophila*. La pérdida de función de estos genes resulta en el bloqueo del desarrollo temprano del ojo (Halder et al., 1995a; Quiring et al., 1994). Del mismo modo que ocurre para estos genes, la pérdida de función de su ortólogo en vertebrados Pax6, produce defectos en el desarrollo de ojo de ratón y en humanos, por ejemplo, Aniridia (Sun and Da-Guang, 2008; Ton et al., 1991).

En *Drosophila* la expresión ectópica de *ey* y *toy* induce ojos ectópicos. La expresión de *toy* es más temprana que la de *ey* e independiente de este último en el primordio de ojo. De hecho, *toy* actúa como un regulador de *ey* (Czerny et al., 1999a; Quiring et al., 1994), regulando directamente la región enhancer, específica de ojo, de *ey* (Hauck et al., 1999). Ambos genes tienen patrones de expresión similares en el primordio de ojo y son los primeros genes en expresarse. Su expresión es homogénea en todo el disco imaginal de ojo-antena durante L1 (Czerny et al., 1999a); (Quiring et al., 1994). Más tarde, durante L2, la expresión de *ey/toy* es restringida a la parte posterior del disco que corresponde al primordio de ojo. Tan pronto como comienza la diferenciación, *toy* y *ey* permanecen en la región anterior al surco morphogenético (MF) en células aún indiferenciadas pero comprometidas para la formación de ojo.

### **7.2 hth/Meis/Prep**

*homothorax* (*hth*) es un gen que codifica para una proteína de la familia TALE con dos dominios conservados, el Homeodominio (HD) de unión al ADN y el Homeodominio-Meis (HM) que se une a extradenticle (*exd*), otra proteína TALE. Esta unión hace posible que ambas proteínas sean importadas, como un dímero,

al núcleo (Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997) (Ryoo et al., 1999). Tanto Hth como Exd son proteínas que están conservadas desde moscas a vertebrados, siendo sus ortólogos en mamíferos los genes de las familias Meis y Prep (Moskow et al., 1995; Rieckhof et al., 1997) y Pbx (Flegel et al., 1993; Rauskolb et al., 1993), respectivamente. Si bien, el patrón de expresión de *homothorax* en el embrión y en los discos imaginales es complejo ((Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997), la expresión de *extradenticle* es uniforme tanto en el embrión como en los discos imaginales. Ambos están presentes en los mismos tejidos (Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997). Antes del comienzo de la diferenciación, *homothorax* se expresa en todo el territorio del disco imaginal de ojo. Una vez iniciada la retinogénesis, tanto *hth* como *exd* se expresan en la región anterior al surco morfogenético y en los márgenes lateral y posterior del disco imaginal de ojo, regiones que formarán la cutícula de la cabeza (Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997); (González-Crespo and Morata, 1995).

El gen *meis* (del inglés: Myeloid ecotropic viral integration site) en ratón fue identificado como un proto-oncogen ((Moskow et al., 1995; Rieckhof et al., 1997)) y por su parte la expresión ectópica de *hth* en los discos imaginales de *Drosophila* suele generar un sobrecrecimiento de los mismos (Pichaud and Casares, 2000). Por otra parte, la expresión ectópica de *hth* en el ojo, causa una pérdida de fenotipo de ojo (Ryoo et al., 1999), es decir el ojo no puede diferenciarse y esto es debido a una represión del proceso de diferenciación (Domínguez and Casares, 2005b).

### **7.3 eyes absent (eya)**

*eyes absent* codifica para un co-activador transcripcional (Eya) que interacciona mediante su dominio C-terminal altamente conservado (Eya-domain, ED) con proteínas de unión a ADN como *sine oculis* (Pignoni et al., 1997a) y *dachshund* (Chen et al., 1997a), interacción conservada también en vertebrados (Heanue et al., 1999). Estas interacciones permiten que Eya se una a los promotores de genes diana (Chen et al., 1997a; Ikeda et al., 2002a). Eya contiene otros dominios conservados como el dominio ED2 localizado en medio

de una de las dos regiones ricas en prolina, serina y treonina que, al parecer, funciona como un dominio activador de la transcripción (Silver et al., 2003). Estos dominios están altamente conservados desde insectos a vertebrados (Borsani, 1999). Cuando *eyes absent* es expresado de forma ectópica en las combinaciones Eya-So y Eya-Dac pueden generar ojos ectópicos ((Chen et al., 1997a; Ikeda et al., 2002a); Kenyon et al., 2003). Además, Eya y So forman un potente activador transcripcional y su capacidad como tal reside en la actividad fosfatasa de Eya (Li et al., 2003a; Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Durante el desarrollo embrionario, *eya* tiene un complejo patrón de expresión, y algunas de las células que expresan *eya* son las que darán lugar al primordio de ojo y de los globos ópticos (Bonini et al., 1998b). Durante los estadios larvarios, *eyes absent* comienza su expresión en L2 y hacia el comienzo de L3 su expresión se ve restringida hacia la región posterior del disco de ojo. Más tarde, tras el comienzo de la retinogénesis, *eya* se expresa en las células posteriores al surco morfogénico y también en una fila de células anterior a éste, así como en un grupo de células que darán lugar a los ocelos (Bonini et al., 1993; Brockmann et al., 2011).

### **7.5 *sine oculis* (so)**

*sine oculis* pertenece a la clase de factores de transcripción SIX y está conservado desde moscas a vertebrados, y sus ortólogos en vertebrados son los pertenecientes a la familia Six2 (Seo et al., 1999), si bien hay otras dos familias de genes Six en vertebrados, cada una con un representante en *Drosophila* (Seo et al., 1999). So codifica para una proteína que tiene un dominio HD conservado (Cheyette et al., 1994b) que sirve de unión al ADN, y un dominio SIX (ver revisión (Kawakami et al., 2000)) el cual funciona como un dominio de unión a proteínas. Gracias a este dominio, So puede interaccionar con el represor Groucho y como ya hemos mencionado anteriormente, también interacciona con Eya (Kenyon et al., 2003b; Kenyon et al., 2005); (Pignoni et al., 1997a). Los mutantes heteroalélicos para *sine oculis* tienen un fenotipo de reducción de ojo y los mutantes nulos causan letalidad (Cheyette et al., 1994b). Esto sugiere que *sine oculis* tiene un

papel esencial durante el desarrollo de ojo, pero además so es importante para el desarrollo del completo sistema visual. Así, so no sólo se expresa en el primordio de ojo durante L3, sino que también se expresa durante el desarrollo embrionario en el dominio conocido como la región de ojo de la que surgen las diferentes estructuras del sistema visual, incluidos los globos ópticos. Durante el estadio 12 se produce la invaginación del primordio del globo óptico desde el ectodermo, pero en mutantes para so esta invaginación no se produce (Cheyette et al., 1994b). Hacia la mitad del estadio embrionario, sólo el primordio de ojo mantiene la expresión de so (Chang et al., 2003) que más tarde es apagada para reaparecer durante las últimas etapas del estadio larvario. En L2 so comienza a expresarse en el margen posterior del disco de ojo, justo después de la aparición de Eya. Se sabe que Eya activa la transcripción de so y ambos genes se regulan mutuamente, siendo el efecto de So sobre eya más débil que en el caso opuesto (Pignoni et al., 1997a). Durante L3, conforme avanza el surco morfogenético, sine oculis se expresa tanto anterior como posteriormente al MF y su función es requerida para el correcto avance del mismo (Cheyette et al., 1994b); (Pignoni et al., 1997a). Además, sine oculis se expresa en el epitelio en desarrollo posterior al MF, donde tiene un papel en la diferenciación neuronal (Cheyette et al., 1994b); (Pignoni et al., 1997a). So, como ya se ha descrito en el apartado anterior, interacciona directamente con Eya y forman un complejo que es requerido para la expresión de dachshund y la correcta diferenciación de la retina (Chen et al., 1997a). Al igual que ocurre con Eya, So es capaz de inducir la formación ectópica de ojo (Weasner et al., 2007).

## **7.6 dachshund (dac)**

*dachshund* es el último en ser activado en la vía de señalización de este grupo de genes tempranos de la retina. Se trata de un gen relacionado lejanamente con la familia de proto-oncoproteínas y co-represores Ski/SnoN (Hammond et al., 1998); (Mardon et al., 1994a). En su secuencia, *dac* contiene dos dominios altamente conservados, conocidos como dominio Dachshund 1 (DD1) y dominio Dachshund 2 (DD2) ((Hammond et al., 1998)). El dominio DD1 es el más

conservado entre *Drosophila* y mamíferos ((Hammond et al., 1998); (Kozmik et al., 1999) y es el que resulta esencial para la función de *dac* y su localización nuclear (Tavsanlı et al., 2004). Sin embargo, el dominio DD2 también es importante, pues es el que interacciona con el dominio ED de Eya ((Chen et al., 1997)).

La expresión de *dac* comienza en L2, sólo después de que Eya sea activado y su patrón de expresión es similar al de Eya, en el margen posterior del disco. En L3, una vez comenzada la retinogénesis, *dac* se expresa en el MF y en las células localizadas inmediatamente posterior a éste, las cuales ya están determinadas como células de retina (Mardon et al., 1994). A pesar de que *dachshund* no es requerido para la progresión del surco morfogenético, sin embargo, es requerido para el avance del mismo y el correcto ensamblaje de los ommatidios en el ojo compuesto de *Drosophila* (Brás-Pereira et al., 2015; Mardon et al., 1994). *Dac* en colaboración con la vía de Dpp actúa para reprimir Hth y asegurar la transición entre las células progenitoras y precursoras, promoviendo así la diferenciación de las células de la retina (Brás-Pereira et al., 2015).

*dachshund* no sólo se expresa en el primordio de ojo, también se ha encontrado su expresión en el disco de pata y en el globo óptico ((Brás-Pereira et al., 2015; Mardon et al., 1994)). En el globo óptico la expresión de *dac* comienza al mismo tiempo que la diferenciación de las células de la lámina (L3 temprana), siendo por tanto un buen marcador de diferenciación de este primer ganglio óptico. *Dac* es detectado tanto en las células precursoras de la lámina como en las neuronas de la lámina completamente diferenciadas ((Brás-Pereira et al., 2015; Mardon et al., 1994); (Huang and Kunes, 1996).

## **Otros genes involucrados en el desarrollo de la retina.**

### **7.7 teashirt y tiptop (*tsh/tio*)**

*teashirt* (*tsh*) codifica para una proteína con 3 dominios zinc-finger (Fasano et al., 1991). Cuando *tsh*, es expresado ectópicamente, es capaz de inducir ojo ectópico en las regiones de la cabeza y antena, al igual que ocurre con *tio*, aunque no en otras regiones (Bessa et al., 2002; Pan and Rubin, 1998;

Papayannopoulos et al., 1998). Si bien, *tio* es más eficiente en la formación ectópica de ojos (Datta et al., 2011). Por otra parte, cuando la expresión de *tsh* es mantenida se produce una represión de la diferenciación del ojo (Singh et al., 2002; Singh et al., 2004), y es que *teashirt* se expresa en el disco de ojo en L3 con un patrón de expresión similar a *ey* y *toy* y forma un complejo con *ey* y *hth* en el dominio II. En este dominio II o estado 2 *teashirt* como parte del complejo *tsh/hth/ey* promueve la proliferación celular e inhibe la expresión prematura de los genes *eya*, *so* y *dac* (Bessa et al., 2002b). *tiptop* (*tio*) es otro gen con dominios zinc-finger, el cual es esencial para la fertilidad y el desarrollo normal de *Drosophila*. *tio* presenta un patrón de expresión coincidente con el de *tsh* en el disco de ojo, así como en los discos de pata y ala (Bessa et al., 2009; Laugier et al., 2005)). *tio* y *tsh* parecen tener una función redundante en los primordios de ojo, pata y ala donde se coexpresan y la represión de cualquiera de estos genes, resulta en una desrepresión de su parálogo para compensar su déficit (Bessa et al., 2009; Laugier et al., 2005), lo que indica que estos genes se regulan negativa y mutuamente para mantener sus niveles de expresión.

## **8. Redes génicas que actúan durante el desarrollo de la retina de *Drosophila*.**

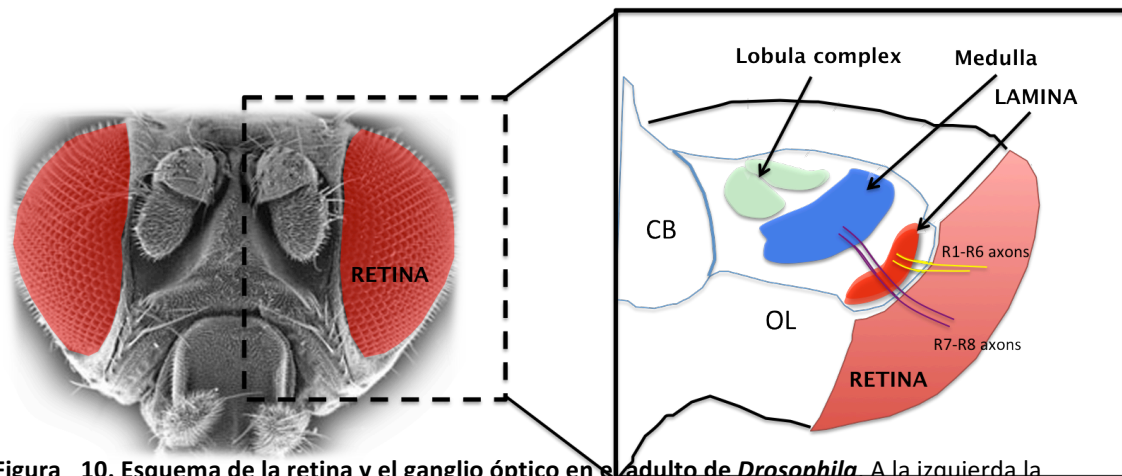
Para el correcto desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*, así como durante cualquier proceso durante el desarrollo de un órgano o tejido, las células necesitan enviar y recibir información para determinar su posición y función dentro del futuro órgano. Esta comunicación celular tiene lugar mediante moléculas de señalización intercelular que pertenecen a diversas rutas de señalización. En particular, durante el desarrollo de la retina de la mosca las vías de señalización que juegan un papel importante son: *hedgehog* (Hh) que corresponde a Shh en vertebrados, *Decapentaplegic* (Dpp) que corresponde a BMP4 en vertebrados, *Notch*, *wingless* (wg) que corresponde a la vía canónica de Wnt en vertebrados, EGFR y JAK/STAT. En este trabajo, nos centramos en las vías de señalización de Wg, Dpp y Hh, y se describen en el capítulo primero de esta



tesis, en una comparativa entre el desarrollo de la retina y el desarrollo del globo óptico de *Drosophila*.

## 9. Desarrollo del primordio de globo óptico.

El globo óptico está dividido en cuatro capas o ganglios subyacentes a la retina en el adulto. Estos ganglios son la lámina, como primer ganglio subyacente a la retina, la médula como segundo ganglio y finalmente el complejo de la lóbula, subdividido en la lóbula y la placa de la lóbula, quedando este complejo en estrecho contacto con el hemisferio cerebral (Figura\_ 10). Durante los estadios larvarios su conformación es algo diferente y no adopta la estructura final hasta sufrir metamorfosis durante la pupación.



**Figura\_ 10.** Esquema de la retina y el ganglio óptico en el adulto de *Drosophila*. A la izquierda la imagen modificada de una microscopía de barrido de la cabeza de *Drosophila* vista de frente. A la derecha el esquema de un corte sagital de la región marcada por la línea discontinua mostrando la disposición de los ganglios del globo óptico con respecto a la retina y a un hemisferio del cerebro central. Los axones están representados por líneas que terminan en el ganglio donde se unen a sus neuronas diana.

Como ya ha sido comentado, el primordio del globo óptico se establece durante los estadios embrionarios 11-12, en los que ya pueden distinguirse dos regiones o labios, el interior (IOA) y el exterior (OOA) que formarán durante los estadios larvarios el Centro Proliferativo Interno (IPC) y el Centro Proliferativo

Externo (OPC), respectivamente. El OPC tiene forma de herradura en la superficie del globo óptico (Figura 4, Introducción Capítulo 1) y el IPC tiene una estructura creciente en la posición más interior del cerebro con respecto al OPC (Figura 4, Introducción Capítulo 1).

Tanto el IOA como el OOA permanecerán inactivos hasta que el embrión eclosione como larva de primer estadio, en este momento las células comienzan a dividirse por la activación del gen *trol*. Estas primeras divisiones parecen estar sincronizadas (White and Kankel, 1978) y continúan hasta el comienzo de la pupación. Un total de aproximadamente 3000 células son producidas en las áreas mitóticamente activas del globo óptico (Campor-Ortega y Hartenstein, 1985). El OPC representa una de las áreas mitóticas principales del globo óptico (Hofbauer and Campos-Ortega, 1990), y dará lugar a la lámina y la médula externa (o córtex medular). El IPC, la segunda área en importancia de actividad mitótica en el globo óptico, representa una reserva de células que formará la médula interna y el complejo de la lóbula. El OPC está formado por un Neuroepitelio (Ne) en el cual las células se dividen activamente y de forma simétrica para dar lugar en la región lateral o anterior a las LPCs y en la región medial o posterior a los neuroblastos de la medula (NB) (Egger et al., 2007).

Las moléculas de secreción Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp) juegan un importante papel en regular tanto la proliferación de los precursores del globo óptico como su consiguiente diferenciación (Kaphingst and Kunes, 1994; Yoshida et al., 2005). *wg* se expresa en ambos extremos de la herradura (OPC), así como en los extremos del IPC, e induce la expresión de *dpp* en las células vecinas. La ausencia de uno de estos genes causa un defecto en la proliferación del OPC, resultando en una disminución de tamaño y causando problemas para la diferenciación de la lámina y la médula. Lo mismo ocurre en mutantes de los genes *minibrain* (Tejedor et al., 1995) y *dally* (*division abnormally delayed*) (Nakato et al., 1995). El estricto control genético de la división celular del globo óptico debe ser esencial para una regulación precisa del tamaño final del órgano y debe coordinarse con el tamaño final del ojo o retina, de manera que, el número de PRs debe de estar compensado con el número de neuronas diana para sus

axones. De hecho, la comunicación entre poblaciones celulares presinápticas y postsinápticas es una característica central de los mecanismos que generan el ensamblaje ordenado de neuronas interconectadas.

Durante el estadio larvario 3, algunas de estas células de la lámina y de la médula comienzan a diferenciarse en neuronas y glía (Green et al., 1993; Hofbauer and Campos-Ortega, 1990) y esta diferenciación está acompañada por la invasión del primer y segundo ganglio del globo óptico por los axones de los fotorreceptores (PRs) (Kunes et al., 1993). Los PRs 1-6 se encargan de la detección de movimiento y los PRs 7-8 están especializados en la detección del color y de la luz polarizada. Los axones R1-R6 terminan en la lámina, formando unidades sinápticas discretas llamadas cartuchos, con las neuronas de la lámina L1-L5, interneuronas centrífugas y amacrinas. La médula subyacente está dividida de forma similar en módulos columnares. Este ganglio está además organizado en 10 capas paralelas M1-M10. Los axones R8 y R7 terminan en las capas M3 y M6, respectivamente. Las diferentes capas o ganglios no tienen unidades sinápticas aisladas, sino que forman parte de un complejo circuito interconectado.

Durante el tercer estadio larvario, tanto el ojo adulto como su estructura diana comienzan a diferenciarse. En el disco imaginal de ojo, como se comenta en el apartado anterior, la secuencia fijada del ensamblaje de ommatidios es iniciada en el surco morfogenético. En el caso de la lámina, la diferenciación ocurre en una progresión temporal en el eje anteroposterior del primordio de la lámina. Cada nueva fila de axones de la retina que entra en el cerebro adquiere una posición más anterior en la lámina e induce una población más anterior de Células Precursoras de la Lámina (LPCs) para entrar en fase S, sufrir una última mitosis, y proceder a la diferenciación neuronal. La interacción entre los nuevos axones que llegan y las LPCs ocurre en una indentación morfogenética conocida como el surco de la lámina (LF), donde los axones entran en estrecho contacto con las LPCs (Selleck et al., 1992). Su llegada y la liberación de la proteína Hedgehog en los globos ópticos en desarrollo induce la diferenciación de las células de la lámina en neuronas y glía (Huang and Kunes, 1996b). Es por ello que, en la lámina en desarrollo, la diferenciación depende de las señales recibidas por las fibras retinales que van llegando y es así estrictamente acoplada a la

diferenciación del ojo. La diferenciación de las primeras neuronas de la lámina tiene lugar una vez que ya hay 4 o 5 filas de fotorreceptores diferenciados en el ED.

Durante la diferenciación de la lámina la LF se extiende hacia afuera en un semicírculo y pasa a través del OPC donde se originan las células que formarán la lámina. A medida que el surco de la lámina avanza hacia afuera, las células a su paso paran su ciclo en G1 (Selleck et al., 1992). Los axones recientemente llegados desencadenan dos eventos en la región de la lámina, por un lado, que se complete la última división celular, y por otro, la diferenciación neuronal de las LPCs. La proteína Hh liberada por los axones de los PRs que llegan al OL es la responsable no sólo para los primeros pasos de la diferenciación de LPCs en neuronas de la lámina (No así para los últimos pasos de la diferenciación de estas neuronas, ver Huang y Kunes, 1996), sino que es la molécula inductora de la última división mitótica que sufren las LPCs en la LF, quedando posteriormente paradas en G1. De no producirse esta última división las LPCs no adquieren la competencia necesaria para expresar el primer marcador de diferenciación de la lámina, *dachshund* (*dac*) (Huang and Kunes, 1996).

A pesar de estos conocimientos, y que la anatomía y conectividad de la lámina se han estudiado en detalle (Fischbach and Ditttrich 1989; Meinertzhagen and O'neil, 1991; Rivera-Alba et al., 2011), no se conoce cómo son generadas las LPCs a partir del Ne, es decir qué genes son los responsables de que las células proliferativas y multipotentes del Ne adquieran el compromiso de convertirse en LPCs. De hecho, se conocen varios marcadores de las células Ne, pero todos ellos han sido estudiados con el objetivo de esclarecer los procesos de diferenciación de estas células en NBs para la consiguiente formación de la médula.

En el caso de la médula, se conoce algo más sobre las señales que inducen a las células neuroepiteliales de la región medial para convertirse en NBs, es decir, en los precursores de las neuronas de la médula. Por ejemplo, las células del Ne que van a originar los NBs comienzan a expresar el gen pro-neural *lethal of scute* (*L(1)sc*), marcando el avance de la onda pro-neural hacia la región más lateral del Ne (Yasugi et al., 2008). Conforme esta onda avanza se induce la diferenciación de los NBs de la medula, los cuales adquieren una posición

paralela al eje apico-basal en la orientación de sus centríolos para sufrir una división asimétrica, dando así lugar a dos células hijas diferentes, una es un NBs y la otra es una célula madre ganglionar (GMC) que a su vez se dividirá para dar dos células hijas que diferenciarán, posteriormente, en neuronas y/o glía de la médula (Egger et al., 2007a). La expresión de *L(1)sc* es suficiente para inducir la formación de los NBs y es necesaria para el inicio oportuno de la diferenciación de los NBs.

*Unpaired (Upd)*, el ligando de la ruta de señalización JAK/STAT se expresa en la región más lateral de las células del Ne, y regula negativamente el avance de la onda pro-neural, controlando así el número de NBs en el OL. Esto demuestra una vez más la importancia de la coordinación entre crecimiento y especificación, de manera, que se adquiera un equilibrio entre el número de neuronas de la lámina (limitado por la invasión de los axones) y el número de NBs de la médula, ambos provenientes de las células del Ne, generando así un mapa topográfico preciso del centro visual.

Además, la vía de señalización JAK/STAT regula otras dos rutas de señalización importantes en la formación y diferenciación de la médula, estas son la vía del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y la vía Notch. La vía de señalización EGFR es la responsable de promover el avance de la onda pro-neural, siendo así la responsable de inducir la expresión de *L(1)sc*. Así mismo, EGFR induce la expresión del ligando de Notch, Delta (DI) y la señal de Notch alarga el estado pro-neural. La vía Notch, presenta un bucle de regulación negativa sobre sí misma, lo cual permite que las células en su estadio pro-neural se desarrollen posteriormente en NBs (Yasugi et al., 2010).

En términos de regulación del ciclo celular, las células Ne que dan lugar a los NBs también sufren una parada del ciclo celular, como las LPCs, antes de convertirse en NBs, ésta parada del ciclo celular está regulada por la vía Fat-Hippo, la cual retrasa la diferenciación, gracias en parte a la molécula E2f, encargada de regular el ciclo. En resumen, la progresión de las células Ne en NBs está regulada por la vía Notch, y las vías JAK/STAT y Fat-Hippo, por otro lado, aceleran el ciclo celular y en consecuencia debilitan la acumulación del ligando Delta, modulando así la vía Notch (Reddy et al., 2010b).

## **10. Modelo de vertebrados. Desarrollo del ojo de vertebrados.**

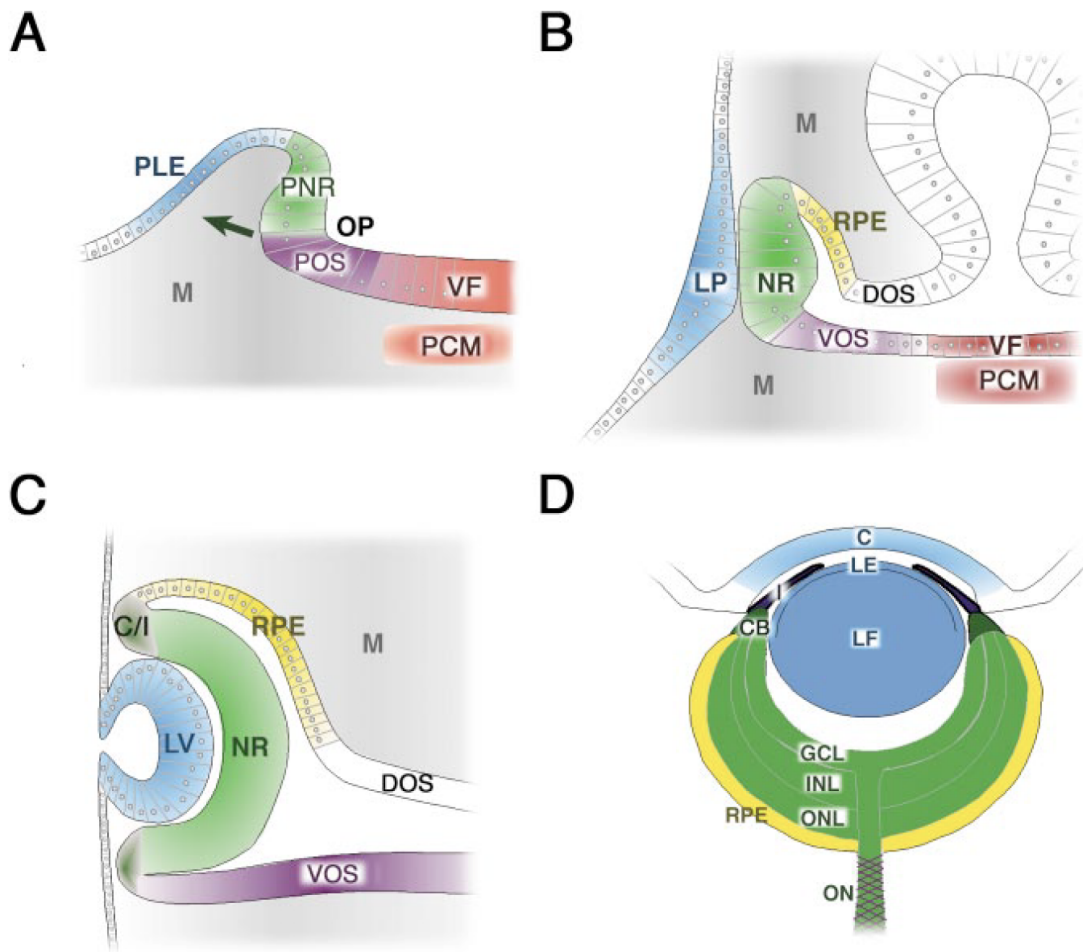
El ojo de vertebrados es una estructura formada a partir tanto del mesodermo como del ectodermo en la región cefálica del embrión. El desarrollo del ojo en vertebrados está íntimamente asociado y coordinado con la especificación y desarrollo del neuro-ectodermo que comienza ya al inicio de la gastrulación. Así, las señales que inducen y controlan la especificación de la placoda neural en la región anterior son a su vez requeridas para la posterior especificación de la región del ojo (Chow and Lang, 2001). Algunos de los factores de transcripción responsables de la especificación de la placoda neural anterior del embrión temprano de vertebrados son: Pax6, Rx, Six3 y Hes1/Rpx, que son a su vez esenciales para el desarrollo del ojo. La expresión de estos factores recae aguas abajo de la inducción neural (Chow and Lang, 2001).

El desarrollo de ojo en vertebrados puede ser subdividido en varias etapas, que a su vez pueden solaparse: (i) La inducción neural en el presunto ectodermo, (ii) La subdivisión antero-posterior de la placoda neural, (iii) especificación y separación de la región del ojo en el territorio del diencéfalo (cerebro rostral), (iv) generación y modelado de la vesícula óptica (v) regionalización de la copa óptica de la retina y el epitelio pigmentario de la retina y (vi) especificación y diferenciación de los siete tipos de células retinianas the se desarrollan a partir de un mismo grupo de células progenitoras de una forma precisa en el tiempo y el espacio ((Chow and Lang, 2001; Sinn and Wittbrodt, 2013; Zagozewski et al., 2014).

### **(i) La inducción neural en el presunto ectodermo**

La inducción neural sigue un mecanismo molecular que probablemente puede ser generalizado para todos los vertebrados (Wilson and Houart, 2004). Factores de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (Fgf) son secretados antes del comienzo de la gastrulación y determinan el tejido neural (Gamse and Sive, 2001; Wessely et al., 2001; Wilson et al., 2000), cuando la señalización mediada por

Wnt es suprimida (Niehrs, 1999; Stern, 2006). Para establecer y mantener el tejido neural como tal es requerida la presencia de moléculas tales como *Chordin*, *Noggin*, *Follistatin*, *Cerberus* y *xnr3* que antagonizan con la señalización de la proteína BMP (del inglés, Bone Morphogenetic Protein) (Bouwmeester et al., 1996; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Niehrs, 2001). Las mencionadas moléculas son secretadas por los centros organizadores, tales como el *organizador Spemann* (en anfibios), el nodo de *Hensen* (en aves) o el nodo de ratones.



**Figura\_ 11. Vista esquemática del ojo de vertebrados en desarrollo.** En los paneles A-D, los primordios o tejidos diferenciados del ojo están coloreados de la siguiente manera: azul, lente/córnea; verde, retina neural; amarillo, epitelio pigmentoso de la retina (RPE);, lila, tallo óptico (en este caso solo se colorea la región ventral); rojo, mesénquima ventral del cerebro rostral; gris, mesénquima. (A) La formación de la vesícula óptica es iniciada con la evaginación (indicada por la flecha) de la región del primordio del cerebro rostral, resultando en la formación del pozo óptico (OP). La región de la vesícula óptica es dividida en la región dorso-distal (verde), la cual contiene el primordio de la retina neural (PNR) y RPE (no mostrado), y la

región próximo-ventral, la cual da lugar a el primordio del tallo óptico (POS); PLE, región del ectodermo del primordio de la lente; M, mesénquima; VF cerebro rostral ventral; PCM, mesodermo precordial. (B) El crecimiento continuo de la vesícula óptica culmina con un período de estrecho contacto con la placoda de la lente (LP) y el primordio de la retina neural (NR) durante el cual importantes señales inductivas probablemente son intercambiadas: RPE, primordio del epitelio pigmentoso de la retina; VOS, tallo óptico ventral; DOS, tallo óptico dorsal. (C) Invaginación de la vesícula óptica resulta en la formación de la vesícula de la lente (LV) y de la retina neural (NR) y establece la completa estructura del ojo. (D) Ojo maduro: C, cornea; LE, epitelio de la lente; LF, células fibrosas de la lente; I, iris; CB, cuerpo ciliar; GCL, capa de células ganglionares; INL, capa interna nuclear; ONL, capa externa nuclear; ON, nervio óptico. Imagen adaptada y traducida de Chow y Lang (2001).

## **(ii) La subdivisión antero-posterior de la placoda neural**

Previamente a la especificación de la región del ojo, así como el telencéfalo y diencefalo, la placa neural anterior tiene que ser subdividida en las regiones anterior y posterior, este proceso es mediado por la vía de señalización de Wnt que promueve la especificación en la región posterior (Kiecker and Niehrs, 2001; Lekven et al., 2001). Mutantes para la vía Wnt carecen de ojos, así como de telencéfalo, mientras que en diencefalo se expande hacia la región anterior (Heisenberg et al., 2001). Varios de los genes importantes para la especificación de la región anterior de la placa neural, incluido Wnt, son también necesarios para la especificación de la región del ojo.

Otx es un miembro de la familia de factores de transcripción *orthodenticle*. Si bien, Otx es restringido a la región anterior hacia el final de la gastrulación (Bovolenta et al., 1997; Simeone et al., 1993)), no está presente en la región del ojo definida por la expresión del gen Rx (Andreazzoli et al., 1999). Sin embargo, a pesar de no ser requerido de forma autónoma celular para la inducción del tejido neural anterior, si es requerido para el mantenimiento de la especificación de la región del ojo, pues en mutantes Otx<sup>-/-</sup> los marcadores de ojo y cerebro rostral, tales como Six3 y Hesx1/Rpx no pueden mantener su expresión (Rhinn et al., 1998). Otx vuelve a expresarse más tarde durante el desarrollo en la vesícula óptica, siendo más tarde restringido al RPE (epitelio pigmentado de la retina) (Bovolenta et al., 1997; Simeone et al., 1993).

Hesx1/Rpx es un factor de transcripción de los pertenecientes a la familia con dominio *paired-like* y se expresa en la región anterior de la placa neural durante



la etapa temprana de gastrulación en ratón y posteriormente su expresión se restringe a la pituitaria anterior (Hermesz et al., 1996). En mutantes para *hesx1* se han observado defectos en el desarrollo de ojo, aunque este fenotipo podría ser una consecuencia de la reducción del cerebro rostral más que un papel directo de *Hesx1* sobre el desarrollo del ojo (Dattani et al., 1998).

Pax 6 es un gen homeobox con un dominio *paired-like* y un dominio *box-paired* que ha mantenido un alto nivel de conservación a lo largo de la evolución (Callaerts et al., 1997); (Cvekl and Piatigorsky, 1996), presente tanto en vertebrados como en invertebrados. En vertebrados, Pax6 se expresa primero hacia el final de la gastrulación en la placa neural anterior ((Del Rio-Tsonis et al., 1995; Grindley et al., 1995; Hirsch and Harris, 1997; Li et al., 1994; Püschel et al., 1992a; Walther and Gruss, 1991). Conforme avanza la neurulación la expresión de Pax6 se encuentra en las vesículas ópticas, así como en el ectodermo que formará las lentes. Pax6 también se expresa en los siguientes estadios del desarrollo del ojo (ver sección iii), de hecho, si bien los mutantes heterocigotos para Pax6 solo muestran un fenotipo de reducción del tamaño de los ojos en ratón (*Small eye*) (Hill et al., 1991; Hogan et al., 1986), la mutación en homocigosis a pesar de producir la copa óptica, la diferenciación en la futura retina neural o en el RPE se ve comprometida (Grindley et al., 1995). Además, Pax6 no sólo es capaz de inducir la formación de ojo ectópicamente en *Drosophila*, sino también en ratón (Halder et al., 1995b), ascidias (Glargdon et al., 1997) y calamar (Tomarev et al., 1997), revelando un alto grado de conservación evolutiva. Por otra parte, se ha visto que Pax6 juega un papel esencial en el mantenimiento del estado multipotente de las células progenitoras de la retina , sin embargo, Pax6 no parece ser requerido para el mantenimiento de la identidad de la retina, ya que los genes *Rx1*, *Six3*, *Six6* y *Lhx2* no se ven afectados en el tejido analizado en mutantes quimeras para Pax6 ((Marquardt et al., 2001; Tomarev et al., 1997).

Six3/Optix2, son dos genes relacionados con los miembros de la familia SIX-homeodomain (de la cual *sine oculis* es el miembro fundador) y comparten alrededor de un 90% de la secuencia proteica con *Optix*, otro gen SIX-homeodomain de *Drosophila* (Toy et al., 1998). *SIX3* juega un importante papel en el desarrollo de la placoda anterior neural, así como en el desarrollo del ojo.

Ambos genes, Six3 y Optix2 se expresan en la gástrula, pero sólo Six3 se expresa en la región del ojo (Bovolenta et al., 1998; Granadino et al., 1999; Jean et al., 1999; Loosli et al., 1998; Oliver et al., 1995; Zuber et al., 1999). Ambos genes se expresan más tarde en la vesícula óptica, así como en estadios posteriores (ver XX). Parece ser que el papel de Six3 en la especificación de la placoda neural anterior está conservado evolutivamente y es una característica muy ancestral, evolutivamente hablando (Arendt and Wittbrodt, 2001; Sinigaglia et al., 2013).

Rx es un gen homeobox con un dominio *paired-like* que tiene un papel esencial en el desarrollo temprano del ojo a juzgar por su patrón de expresión y por los fenotipos como resultado de su pérdida de función (Furukawa et al., 1997; Mathers et al., 1997; Zhang et al., 2000). Rx se expresa en la placoda anterior neural y tras la neurulación se expresa abundantemente en las vesículas ópticas, así como más tarde en la retina neural. En algunos casos los mutantes Rx<sup>-/-</sup> pierden totalmente el cerebro rostral, en otros casos el cerebro rostral está presente pero no se forma la vesícula óptica y la región donde normalmente se formaría la vesícula óptica carece de los marcadores Pax6, Six3 y Optix2 (Zhang et al., 2000).

### **(iii) Especificación y separación de la región del ojo**

Los mismos genes anteriormente mencionados, Six3, Rx3 y Pax6 especifican la región del ojo en una única y céntrica región en la placa neural anterior. Justo después, comienzan a ser secretados una serie de factores de las familias Tgf- $\beta$ , Fgf y Shh desde el mesodermo axial subyacente para separar la región del ojo en dos primordios bilaterales simétricos. En respuesta a los factores secretados, como Tgf- $\beta$  las células del futuro hipotálamo migran desde una posición posterior hacia la región del ojo. Esta corriente media de células separa la región central y única especificada para ojo y establece dos primordios de ojo separados (England et al., 2006); (Hirose, 2004; Varga et al., 1999). Algunos de los factores de transcripción específicos de ojo adoptan entonces un patrón de expresión en dos dominios laterales. La señalización mediada por Shh es crucial para el establecimiento de la línea media y los dos dominios laterales que darán lugar a sendas y simétricas vesículas ópticas (Chiang et al., 1996). Six3 es el encargado de

regular la expresión de Shh en el cerebro rostral en desarrollo. Los mutantes para Shh presentan cyclopia, que consiste en la presencia de un único ojo central, resultado del fallo para separar la región de ojo en los primordios ojo simétricos y bilaterales. La mutación de Six3 también resulta en cyclopia (Carl and Wittbrodt, 1999).

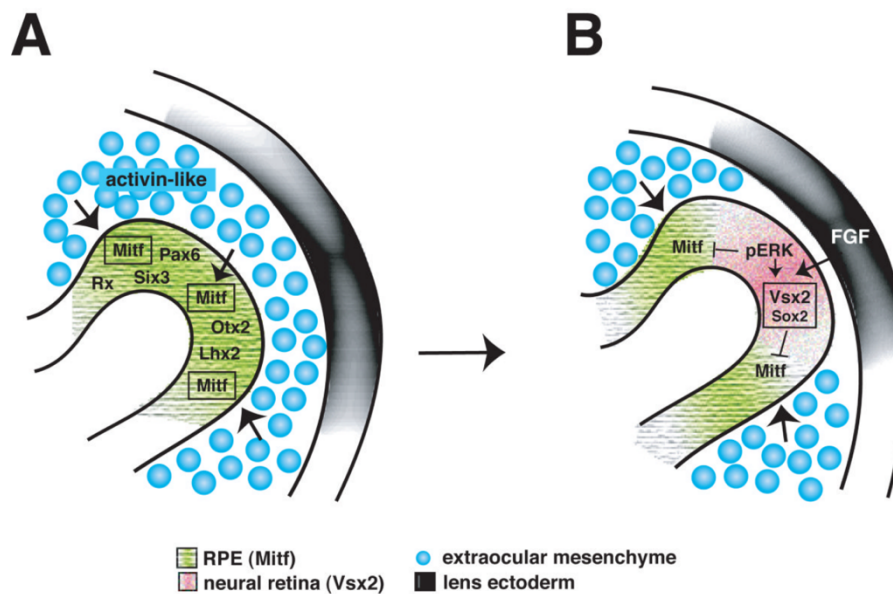
#### **(iv) Generación y modelado de la vesícula óptica**

Tras la bisección de la región del ojo en dos primordios simétricos bilaterales, periodo en el que esta región se expande, la vesícula óptica (VO) se forma por evaginación del neuroepitelio ventral del cerebro rostral hacia la superficie del ectodermo superpuesta (Zagozewski et al., 2014). Esto ocurre al comienzo de la neurulación, en el estadio 19-22hpf en pez-cebra, en el estadio E8.5 en ratón y en el estadio HH 9-10 (33hpf) en pollo (Hamburger and Hamilton, 1992). En pez-cebra la expansión y la evaginación lateral de la vesícula óptica desde el cerebro rostral es dirigida por la migración lateral de células progenitoras de la retina (RPCs) que expresan rx3 (Rembold et al., 2006).

A medida que la vesícula óptica se va evaginando, esta se va especificando en sus ejes dorso-ventral (D-V) y proximo-distal (P-D). La señalización mediada por Shh desde la línea media es necesaria para el establecimiento de estos ejes. En el eje D-V Shh establece la identidad ventral de la vesícula óptica, dirigiendo la expresión de los factores de transcripción Vax1 y Vax2 (Sasagawa et al., 2002; Take-uchi et al., 2003). Más tarde en el desarrollo. Vax1 es restringido al tallo óptico (Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999; Mui et al., 2005) mientras que Vax2 se localiza en la región ventral de la retina neural de la copa óptica (Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999; Mui et al., 2005) (Barbieri et al., 1999; Mui et al., 2002). Pax6 también es requerido para la ventralización de la VO ((Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999; Mui et al., 2005)).

Shh también es esencial para la especificación P-D de la VO. Shh induce la expresión de Pax2 que determina la región del tallo óptico. La represión mutua entre Pax2 y Pax6 controla el límite de las regiones que formarán la copa óptica y el tallo óptico, siendo Pax6 el que determina la especificación de la copa óptica

(Grindley et al., 1995; Krauss et al., 1991; Püschel et al., 1992b; Walther and Gruss, 1991). La región dorsal de la VO requiere la proteína BMP4, de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que induce la expresión del gen *Tbx5*, específico de la región dorsal. El factor de transcripción *Lhx2* con homeodominio LIM resulta también esencial para el desarrollo de la VO. Mutaciones en este gen detienen el desarrollo antes de que la VO pueda transformarse en la copa óptica (Hägglund et al., 2011; Porter et al., 1997; Yun et al., 2009). En estos mutantes la expresión de *Tbx5* y *Vax2* se ve afectada y por tanto el eje D-V ((Hägglund et al., 2011; Porter et al., 1997; Yun et al., 2009)).



Figura\_ 12. Especificación del RPE y la retina en la copa óptica. Los factores de transcripción de la región del ojo Pax6, Rx, Otx2, Six3, así como también Lhx2 son requeridos en la vesícula óptica para responder a las señales inductoras. (A) Especificación del RPE en ratón (vesícula óptica temprana): el mesénquima extraocular, posiblemente mediante la producción de un factor activador (activin-like), induce la expresión de Mitf en toda la vesícula óptica. (B) La especificación de la retina en ratón y pollo (vesícula óptica tardía): Subsecuentemente, la activación de ERK (una MAPK), posiblemente a través del factor FGF secretado desde el ectodermo de la lente, induce/mantiene la expresión de Vsx2 y Sox2 en la vesícula óptica distal para promover el desarrollo de la retina, la cual requiere la supresión de Mitf mediada por Vsx2. Imagen adaptada y traducida de Sabine Fuhrmann (2010).

#### (v) Regionalización de la copa óptica de la retina y el epitelio pigmentario de la retina.

Durante la evaginación de la vesícula óptica, tanto el dominio de la retina neural (RN) como el del epitelio pigmentario de la retina (RPE) son especificados. La retina neural se desarrolla desde la porción distal/ventral de la VO, mientras que el RPE emerge desde la región dorsal (Hirashima et al., 2008; Kagiya et al., 2005). Una vez la vesícula óptica se ha evaginado, sufre una serie de transformaciones morfogénicas para convertirse en una copa óptica (CO) de forma hemisférica a partir de la vesícula que tiene forma esférica. La capa externa de la copa óptica da lugar al RPE mientras que la capa interna se desarrolla en la NR (ver Figura\_11).

En este estadio (HH14-15 en pollo, E11.5 en ratón y a las 24-30hpf en pez-cebra), el epitelio es bipotencial, esto significa que la región que formará la retina puede dar lugar al RPE (Horsford et al., 2005; Rowan et al., 2004) y viceversa, el RPE puede dar lugar a la retina con las señales adecuadas (Coulombre and Coulombre, 1965; Galy et al., 2002; Stroeve and Mitashov, 1983). El factor de transcripción *Lhx2* que fuera inicialmente expresado en el territorio del ojo previo a su bisección, también es requerido durante la formación de la copa óptica para activar la expresión del gen *Mitf* y otros determinantes de la retina (Yun et al., 2009; Zuber et al., 2003). *Mitf* es un factor de transcripción bHLH específico del RPE, el más temprano en ser expresado inicialmente en toda la vesícula óptica y siendo restringido más tarde por el gen homeobox *Vsx2* (también llamado *Chx10*), que inhibe *Mitf* en el dominio distal. Así, la represión de *Mitf* por parte de *Vsx2* permite el desarrollo de la región distal de la VO en la retina neural. *Vsx2* es, por tanto, específico para la retina neural y además controla otros aspectos como la proliferación celular (Green et al., 2003) (Sigulinsky et al., 2008).

Otro factor que induce la expresión de *Mitf* es TGF- $\beta$ , que a su vez induce la expresión de *Otx2*, ambos en la región distal de la VO.  $\beta$ -catenin es también esencial para especificar y mantener la identidad del RPE en la CO, mediante la activación de los genes *Mitf* y *Otx2* (Westenskow et al., 2009).

Para el desarrollo de la retina neural es esencial el contacto de ésta con el ectodermo, tanto es así que la retina no llega a desarrollarse cuando se extrae el ectodermo quirúrgicamente (Holtfreter, 1939). En anfibios, si la copa óptica se ve

forzada a rotar 180 grados de forma que el primordio del RPE queda en la proximidad del ectodermo, éste se transformaría en una segunda retina neural (Detwiler and Van Dyke, 1953); (Lopashov and Stroevea, 1964); Mikami, 1939). Una razón plausible parece ser la secreción de moléculas de señalización desde el ectodermo. Entre estas moléculas están, FGF que es esencial para el desarrollo de la retina neural y capaz de inducir por sí solo la especificación de la retina neural a partir de otros tejidos como el primordio del RPE (Guillemot and Cepko, 1992)(Opas and Dziak, 1994). FGF es secretado por el ectodermo en contacto con el primordio de la retina neural y es necesario para mantener el dominio de la RN en la región distal de la vesícula (Hyer et al., 1998). FGF es importante para el mantenimiento de la expresión de *Vsx2* y la represión de *Mitf*, permitiendo así que el tejido se comprometa a formar la RN.

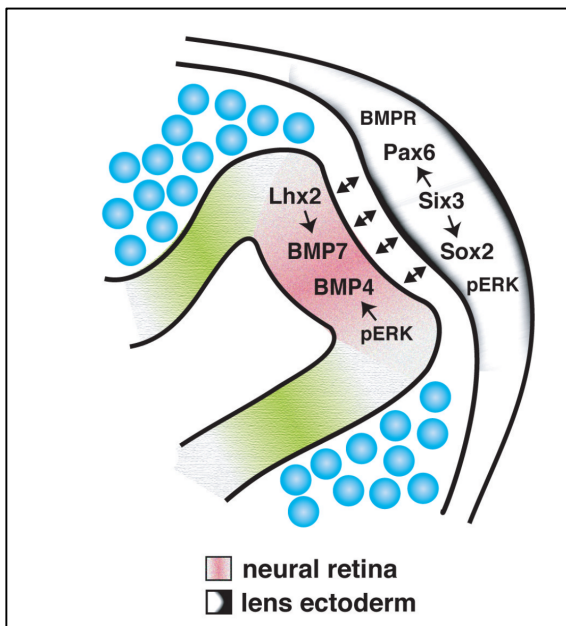
En cuanto a la lente, Spemann en 1901 propuso que el desarrollo de la lente depende del primordio de la retina. En *Xenopus*, la especificación de la lente se establece justo cuando la vesícula óptica entra en contacto con el ectodermo superpuesto de la lente (Henry and Grainger, 1990). En ratón y pollo, también ocurre una vez que el contacto entre ambos tejidos es establecido (Furuta and Hogan, 1998).

La expresión de *Pax6* es esencial para la inducción de la lente (Ashery-Padan et al., 2000). *Pax6* se expresa en la superficie del ectodermo superpuesto a las vesículas ópticas al comienzo de la diferenciación de la lente y su patrón de expresión es restringido más tarde a las células epiteliales proliferativas de la lente (Grindley et al., 1995). Mutantes *Pax6* carecen de la placoda de la lente y pierden la expresión de los genes *Six3* y *Prox1*, sugiriendo que estos se encuentran aguas abajo de *Pax6*. Sin embargo, *Six3* es requerido para el mantenimiento y activación de *pax6* y *Sox2*, respectivamente (Kamachi et al., 2001). Esto puede explicarse porque *Pax6* y *Sox2* forman un complejo de unión al ADN que regula el inicio del desarrollo de la lente (Kamachi et al., 2001) y se ha visto que se regulan mutuamente al menos en la neurogénesis del epitelio olfativo de ratones (Packard et al., 2016), explicando la carencia de *Six3* en mutantes *Pax6*.

Por otra parte, *BMP4* y *BMP7* tienen un patrón de expresión solapante en el ojo en desarrollo y también juegan un papel importante en los estadios tempranos del

desarrollo de la lente. Mutantes para estos genes pierden la placoda de la lente, así como la expresión de Pax6 (Wawersik et al., 1999). En estos mutantes hay un fallo en la activación del factor de transcripción Sox2 en el ectodermo de la lente. Sox2 y Sox3 se expresan antes de la formación de la placoda de la lente, en la superficie del ectodermo ventral, rodeando el primordio de la lente (Kamachi et al., 1998). Parece ser que existe una regulación recíproca entre Sox2/3 y Pax6, de forma que ayudan a restringir y mantener la expresión de estos genes en la placoda de la lente.

Una vez más, FGF es importante en el desarrollo del ojo, en este caso para el desarrollo de la lente. Existe una interacción genética entre FGF y BMP7, de modo que ambos cooperan para la activación de la expresión de Pax6 en la placoda de la lente. BMP4 y uno o más ligandos FGF regulan directa o indirectamente Sox2 en las células del primordio de la lente (Chow and Lang, 2001).



**Figura\_ 13. Especificación de la lente.** La invaginación de la placoda de la lente requiere la correcta especificación del ectodermo de la lente que depende del mantenimiento y activación de Pax6 y Sox2, respectivamente, por parte de Six3. La señalización de FGF y BMP puede ser también requerida para la inducción de la lente. En la vesícula óptica distal, la expresión de BMP4 y BMP7 es crucial para la especificación del ectodermo de la lente y la invaginación de la vesícula óptica. La expresión de BMP requiere la activación de Lhx2 y la señalización de FGF. Imagen adaptada y traducida de Sabine Fuhrmann (2010).

## (vi) Especificación y diferenciación de los siete tipos de células retinianas.

La retina de vertebrados consta de seis tipos de células neuronales y un tipo de células de la glía que surgen de un mismo grupo de células precursoras de la

retina (RPCs) multipotentes (Turner and Cepko, 1987). En la retina de vertebrados la diferenciación de las RPCs sigue un orden estereotípico que está conservado entre las diferentes especies de vertebrados (Cepko et al., 1996a; Livesey and Cepko, 2001). Las células ganglionares de la retina son las primeras neuronas generadas en la retina en todos los vertebrados analizados.

Desde el lugar de origen de la diferenciación neuronal una ola de neurogénesis recorre la retina (Hu and Easter, 1999; Laessing and Stuermer, 1996; McCabe et al., 1999; Young, 1985b) y por analogía con *Drosophila*, Shh ha sido propuesto como conductor de esta ola de diferenciación (Neumann and Nusslein-Volhard, 2000). Pero a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, el inicio de la ola de diferenciación en la retina de vertebrados es independiente de Shh (Neumann, 2001).

Resulta interesante que el punto preciso donde nacen las primeras neuronas está estrechamente regulado tanto en el tiempo como en el espacio (Sinn and Wittbrodt, 2013). Sin embargo, la localización del centro de neurogénesis se encuentra en diferentes posiciones dependiendo de la especie de vertebrado analizada. Así, en pez-cebra la fuente que inicia la señal de diferenciación se encuentra en el tallo óptico que corresponde a la región ventro-nasal (Masai et al., 2000) y desde allí la ola de diferenciación sigue el sentido de las agujas del reloj (Ver Figura 49 del Capítulo 2). En embrión de pollo, sin embargo, al igual que en muchos otros vertebrados, la diferenciación de la retina es iniciada en un dominio central distante del tallo óptico y luego se expande hacia la periferia. Pero, tanto en pez-cebra como en pollo, la producción de FGF desde sus respectivas fuentes de inicio inducen la diferenciación de las células ganglionares de la retina (Martinez-Morales et al., 2005).

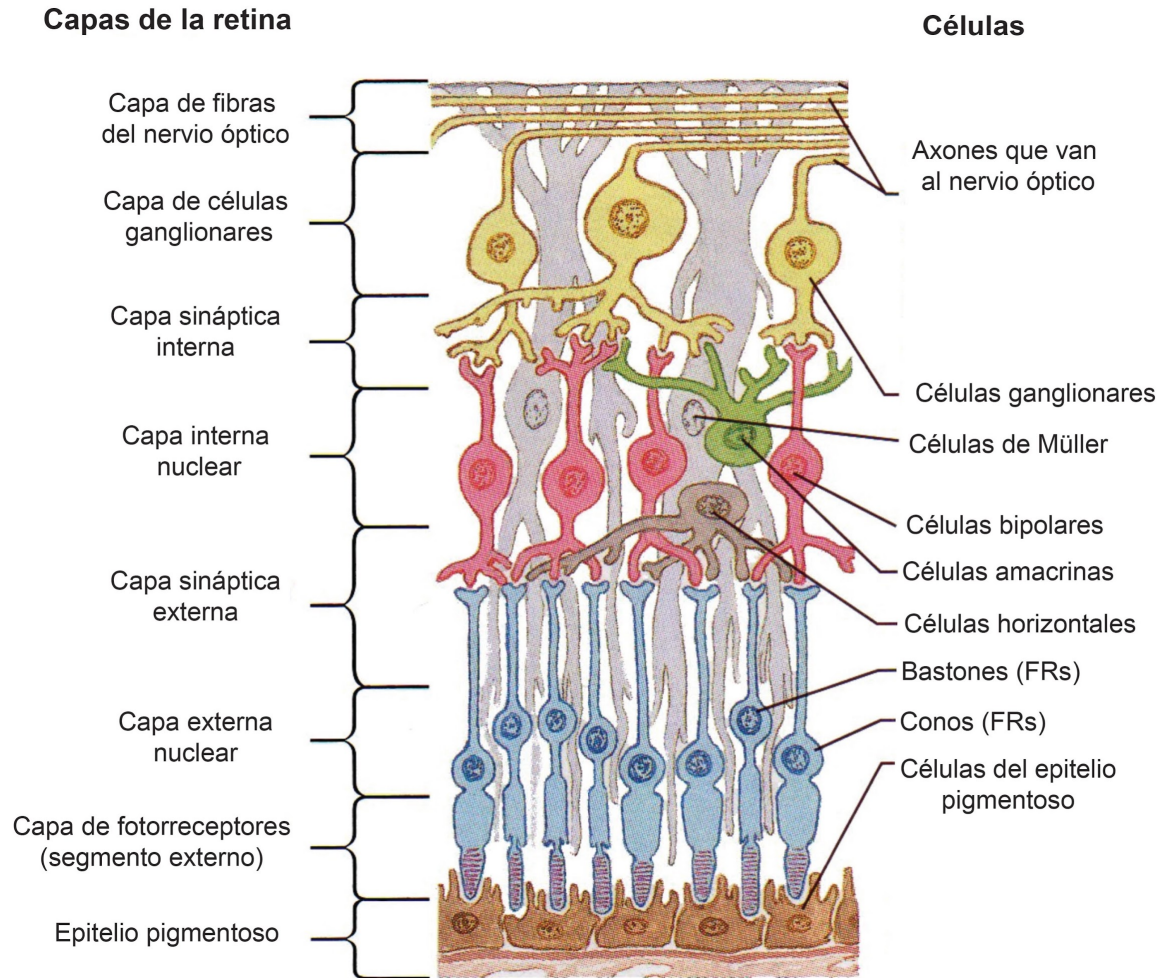
**Organización de la retina.** Las células de la retina se originan en el siguiente orden: las células ganglionares de la retina (RGCs), células horizontales seguidas de las células fotorreceptoras (conos) se desarrollan durante la primera etapa de la histogénesis, y más tarde en la segunda etapa se desarrollan en el siguiente orden las células amacrinas, las células bipolares, las células fotorreceptoras (bastones) y las células de la glía de Müller (Young, 1985a). Estas células se



organizan en la retina madura en una estructura trilaminar que incluye: la capa de células ganglionares (GCL), la capa nuclear interna (INL), y la capa nuclear externa (ONL). Sobre esta última capa, la ONL, se encuentra el epitelio pigmentoso (RPE). Las proyecciones de las células de la retina y como consecuencia, las conexiones sinápticas que tienen lugar entre ellas, están organizadas en dos capas adicionales conocidas como capas sinápticas interna y externa (ver imagen).

En la GCL es la capa más interna de la retina donde se encuentran las células ganglionares, seguidamente se encuentra la capa plexiforme (o sináptica) interior que alberga las proyecciones de las células ganglionares así como las proyecciones de las células amacrinas y bipolares que residen en la INL. Sobre la INL se encuentra la capa sináptica externa que contiene las proyecciones tanto de las células horizontales como los axones de las células fotorreceptoras que se encuentran justamente encima en la ONL. Las células de Müller son células de glía radial que dan soporte al resto de células de la retina, sus núcleos se encuentran en la capa nuclear interna pero sus prolongaciones se extienden abarcando todas las capas retinianas. Hay que decir que a pesar de que todos los vertebrados comparten estos tipos celulares y su organización, el subtipo celular y el número de células puede variar de un organismo a otro (Fadool and Dowling, 2008).

**Fisiología.** En el ojo de vertebrados, la luz entra a través de la pupila y después de ser enfocada a través de la lente atraviesa todas las capas celulares de la retina hasta alcanzar la ONL. En la ONL, residen las células fotorreceptoras que convierten la luz en impulsos eléctricos que son semi-procesados por la red neural de la INL, llegando finalmente a las células ganglionares, cuyos axones convergen en una pequeña área de la retina, llamada "punto ciego" o "papila", porque carece de fotorreceptores, donde forman el nervio óptico que viaja hacia el cerebro donde las señales pueden ser procesadas en forma de imagen.



**Figura\_ 14. Esquema de las diferentes capas de la retina de vertebrados.** Cada uno de los 7 tipos de células de la retina está representado. En el margen superior los axones de las células ganglionares se reúnen para formar el haz de fibras del nervio óptico. En la región inferior de la imagen está representado el epitelio pigmentado.

**Desarrollo de la retina.** Las células precursoras de la retina requieren la expresión de Pax6 para ser mantenidas en un estado multipotencial (Marquardt et al., 2001). Como ya se ha mencionado anteriormente, Vsx2 juega un papel crítico en la proliferación de las RPCs, presentando los mutantes ojos de menor tamaño con una severa reducción en la proliferación celular (Burmeister et al., 1996).

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el punto de inicio de la diferenciación de la retina, así como la dirección de la onda de diferenciación, son diferentes según el organismo, pero todos los vertebrados comparten el

hecho de que las células ganglionares son las primeras en comenzar su diferenciación.

El factor de transcripción bHLH Atoh7 (anteriormente Math5) es requerido para la especificación de las RGCs. El factor de transcripción con homeodominio POU, Brn3b (también conocido como Pou4f2) es requerido para la completa diferenciación de las RGCs. Atoh7 no sólo especifica las RGCs, sino que activa genes necesarios para su diferenciación, activando así Brn3b (Brown et al., 2001; Wang et al., 2001). Por su parte, el gen homeobox Dlx también juega un papel importante en la diferenciación de las RGCs mediante la regulación del receptor de la neurotrofina Trkb (de Melo et al., 2008). Un reciente trabajo de Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2017) muestra que DLX1 y DLX2 regulan la expresión de Brn3b. Resulta interesante que un año antes Chunsheng Qu y colaboradores publicaran que Fezf2, un factor de transcripción con 6 dominios Zinc-finger, regula la transcripción de Brn3b y la supervivencia de las RGCs. Además, Fezf2 se une y activa la región reguladora de Brn3b (Qu et al., 2016b).

Las células horizontales son las encargadas de mediar las interacciones entre los fotorreceptores y las células bipolares en la capa sináptica externa. El factor de transcripción “forkhead/winged” Foxn4 es esencial para el desarrollo de las células horizontales, así como también para el desarrollo de las células amacrinas, mediante la activación de los genes *cut1* y *Ptf1a* (Fujitani et al., 2006). Los genes homeobox Prox1 y Lhx1 que están aguas abajo de Onecut1 y Ptf1a, son esenciales para la diferenciación de las células horizontales y su posición, respectivamente (Dyer et al., 2003; Fujitani et al., 2006; Poche et al., 2007).

Las células fotorreceptoras son las encargadas de convertir la luz en señales visuales mediante fototransducción. El gen Otx2, además de especificar el cerebro rostral y el RPE, es requerido para especificar las células fotorreceptoras, conos y bastones. La importancia de la función de Otx2 en la retina se ve reflejada por muchas anomalías oculares como la microftalmia y anoftalmia (Beby and Lamonerie, 2013; Ragge et al., 2005). El miembro relacionado con la familia de Otx, Crx, es requerido para el desarrollo y mantenimiento de los fotorreceptores (Furukawa et al., 1999). Mutantes para Crx desarrollan retinitis

pigmentosa (Sohocki et al., 1998). Una vez especificados, conos y bastones dependen de una serie de factores de transcripción adicionales para su diferenciación, como Nrl (para la diferenciación de los bastones) (Mears et al., 2001; Sohocki et al., 1998) y Trb2 (para la diferenciación de los conos) (Mears et al., 2001)(Swaroop et al., 2010), aunque la diferenciación de los conos no está muy bien estudiada (Zagozewski et al., 2014).

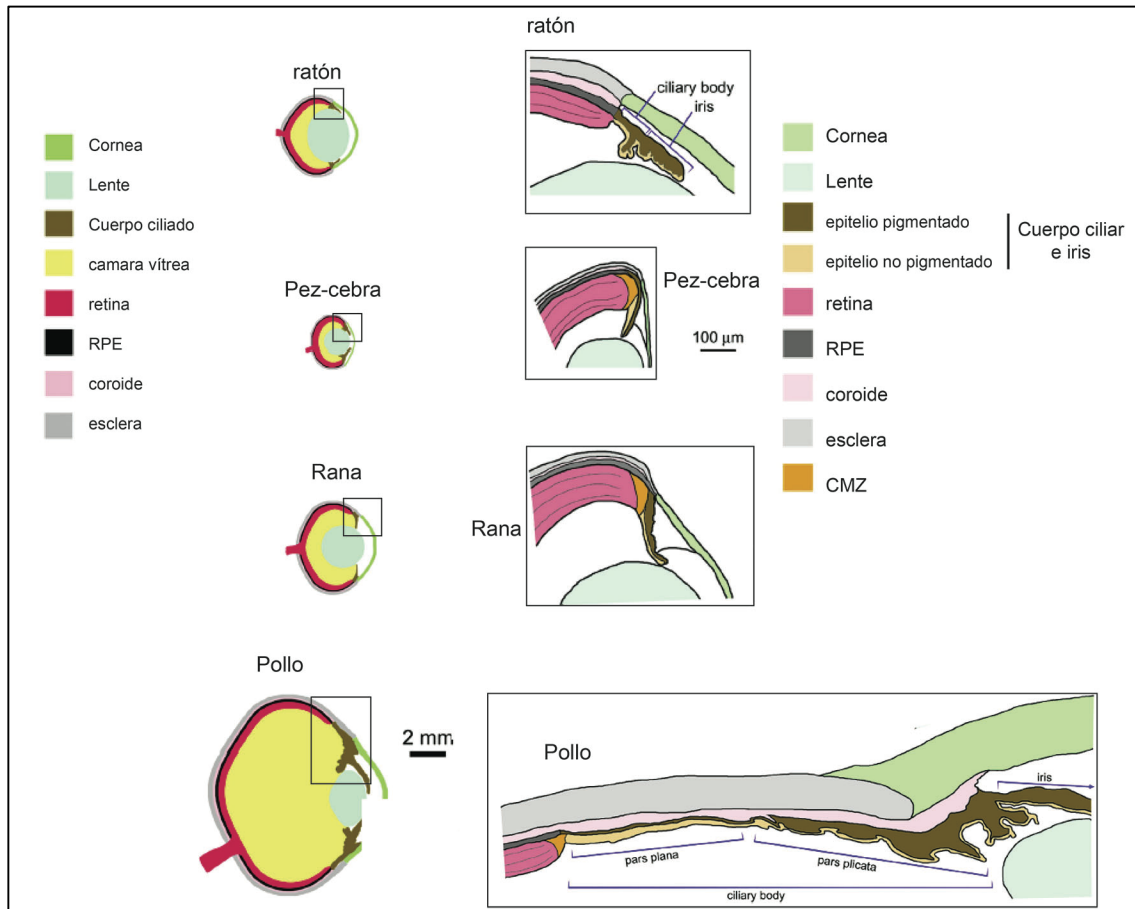
Las células amacrinas, localizadas en la capa nuclear interna extienden sus procesos a la capa sináptica interna para mediar las interacciones laterales entre células bipolares y las RGCs. La especificación de las células amacrinas requiere muchos de los mismos genes necesarios para especificar las células horizontales, como es el caso para los genes Foxn5 y Ptf1a, que cae aguas abajo de Foxn5 (Fujitani et al., 2006; Li et al., 2004). Parece ser que una red reguladora de genes, donde la expresión en paralelo de Ptf1a y los genes bHLH Math3/NeuronD dirige la producción de células amacrinas RPCs Foxn4+ mientras que una población distinta de RPCs Foxn4- también requiere de los mismos genes Math3/NeuronD para determinar una subpoblación de células amacrinas (Inoue et al., 2002). Existen muchos subtipos de células amacrinas (Inoue et al., 2002; Masland, 2012).

Las células bipolares conectan los fotorreceptores con las RGCs, al mismo tiempo que interactúan con células amacrinas y horizontales durante este proceso. Vsx2 es crucial también para la especificación de las células bipolares (Burmeister et al., 1996). Así Blimp1 restringe los precursores Otx2+ para evitar la formación de células bipolares en favor de los fotorreceptores mediante la represión de Vsx2 (Brzezinski et al., 2013; Burmeister et al., 1996; Nishida et al., 2003). Y por contra Vsx2 reprime la formación de los fotorreceptores en favor del desarrollo de las células bipolares (Dorval et al., 2006; Livne-Bar et al., 2006). También existen muchos subtipos de células bipolares definidos por un patrón de expresión génico único (Star et al., 2012).

Las células de la glía de Müller son las últimas en ser producidas y sus procesos celulares se extienden abarcando todas las capas retinianas para dar apoyo a las demás células de la retina y a su funcionamiento.

## **Proliferación celular en el ojo adulto. ZONA MARGINAL CILIAR.**

En la retina existe neurogénesis persistente durante toda la vida en peces y anfibios en la llamada zona marginal ciliar (CMZ), localizada en la parte anterior del globo ocular. Esta capacidad se ha perdido especialmente a lo largo de la evolución en mamíferos. No obstante, se conservan células madre y progenitoras retinianas en el cuerpo ciliar de todos los mamíferos estudiados, en las cuales es posible inducir su diferenciación en neuronas de la retina tanto *in vitro* como *in vivo* (Ahmad et al., 2000; Cepko et al., 1996b; Martínez-Navarrete et al., 2008; Reh and Fischer, 2001; Xu et al., 2007). En peces y anfibios, el crecimiento continuo del ojo durante toda la vida se ve acompañado de un proceso de retinogénesis de las células madre neurales, la cual tiene lugar en la ya mencionada CMZ, un área germinal circular localizada en el borde anterior de la retina periférica (Amato et al., 2004; Hitchcock et al., 2004; Reh and Levine, 1998); (Moshiri et al., 2004; Raymond et al., 2006). Parece ser que las aves también presentan una CMZ con capacidad proliferativa y neurogénica, pudiendo producir nuevas neuronas de la retina en estado adulto, aunque esto ocurre de forma mucho más pausada que durante el desarrollo embrionario (Figura\_ 15) (Fischer and Reh, 2000; Fischer et al., 2013; Ghai et al., 2008; Kubota et al., 2002). Estas células expresan la mayoría de factores presentes durante la diferenciación embrionaria de la retina (Raymond et al., 2006), siendo capaces de auto-renovarse y diferenciarse en células de la retina incluso después de que la diferenciación de la retina haya concluido (Amato et al., 2004; Straznicky and Gaze, 1971; Wetts et al., 1989).



**Figura\_ 15. Anatomía comparada de la región de la CMZ de diferentes clases de vertebrados**, incluidos pez-cebra (pez), rana (anfibio), pollo (ave) y ratón (mamífero). A la izquierda se incluyen ilustraciones de secciones longitudinales de ojo de las distintas clases de vertebrados a escala. Las ilustraciones incluyen representaciones de la córnea, la lente, el cuerpo ciliar, la cámara vítrea, la retina, el RPE, el coroide y la esclera. A la derecha las ilustraciones muestran a mayor magnificación las regiones de cada recuadro de las respectivas ilustraciones de la izquierda, mostrando los diversos tejidos y la localización de la zona marginal ciliar (CMZ). Las barras de escala representan 2mm a la izquierda y para las imágenes de la derecha 100um. Imagen obtenida y modificada de Andy J. Fischer (Fischer et al., 2013).







# Capítulo 1

## Estudio de la red de regulación génica que especifica la lámina, el primer ganglio del globo óptico de *Drosophila*

### INTRODUCCIÓN

#### 1. Diferencias y similitudes entre la retina de vertebrados y la retina de *Drosophila*.

En la naturaleza existen ojos con una gran diversidad morfológica, tipos de receptores y estructura de sus lentes (cuando presentan esta última), por ello, se ha propuesto que los sistemas visuales han evolucionado una y otra vez (Nilsson, 2004). Incluso en un mismo organismo como *Drosophila*, podemos encontrar varios tipos de ojos: ojos simples (ocelos), ojos compuestos y el ojo de la larva (órgano de Bolwig), siendo éste último un tipo de órgano fotosensible. Cada uno de ellos varía en morfología, pero también en el tipo y composición de sus fotorreceptores, así como en la presencia/ausencia de lente.

Una diferencia importante entre la retina de vertebrados y el sistema visual de *Drosophila* radica en el hecho de que la retina de vertebrados está formada por una estructura estratificada (Piccolino et al. 1989; Ramón y Cajal y Sanchez 1918) que contiene tanto fotorreceptores como las neuronas que procesan y que contiene tanto fotorreceptores como las neuronas que procesan y transducen la información visual recibida por aquéllos, además del hecho de que todos estos tipos celulares se originan a partir de una misma fuente de progenitores. En el caso de *Drosophila*, lo que denominamos "retina" queda restringido a la capa externa del ojo, compuesta únicamente por fotorreceptores y células accesorias. Sin embargo, las neuronas diana de estos fotorreceptores encargadas de procesar la información y transmitirla al cerebro se encuentran en el globo óptico ("Optic Lobe", OL) subyacente. Esta estructura, permanece conectada con el primordio de la retina desde los

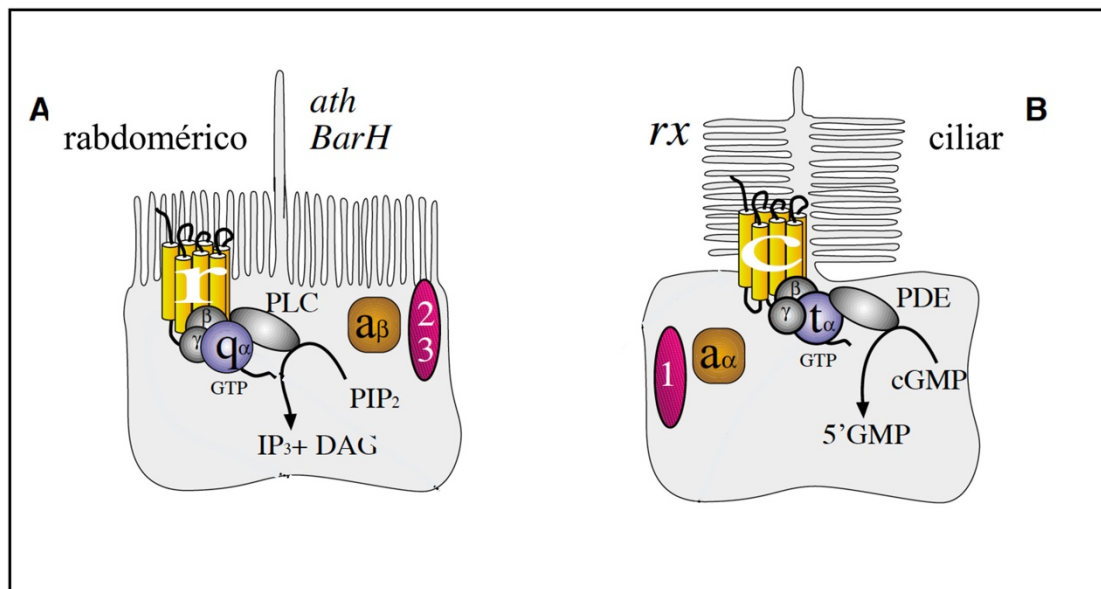
primeros estadios del desarrollo (Green et al., 1993; Chen, 1929; Madhavan and Schneiderman, 1977).

Así mismo, retina y OL se forman a partir de primordios diferentes y por tanto a partir de células progenitoras de diferentes fuentes; del disco de ojo, en el caso de la retina y de los neuroepitelios interno (IOA) y externo (OOA), en el caso de los globos ópticos. Sin embargo, ambos primordios, así como el ojo de la larva, se originan de una misma región del embrión que corresponde al ectodermo dorsolateral de la cabeza que se conoce como la “región visual” (Green et al., 1993). Esta región está definida por el gen temprano de ojo, *sine oculis* (Cheyette et al., 1994; Daniel et al., 1999), por tanto, ambas estructuras tienen un origen embrionario y genético común. No obstante, resulta sorprendente observar que, pese a las disparidades morfológicas de los sistemas visuales de diferentes organismos, todos ellos están controlados por redes génicas (RGs) que comparten muchos de sus elementos clave (Figura 3; Gehring, 2005). Estas similitudes genéticas implican que todos los ojos han evolucionado desde un prototipo ancestral común, algo que ya se planteaba hace más de 150 años, (Darwin, 1859; Arendt et al., 2004; Lamb et al., 2009; Lamb et al., 2013).

Dentro de este escenario evolutivo existen dos hipótesis distintas (ver revisión Erlick et al., 2009). La **hipótesis 1** propone que la retina de vertebrados está compuesta de tipos celulares derivados de dos poblaciones de fotorreceptores (FR) ancestrales distintas. Estos dos tipos de fotorreceptores son los fotorreceptores rabdoméricos y los fotorreceptores ciliares. Ambos tipos celulares se caracterizan por un aumento de su superficie de membrana para poder almacenar el fotopigmento o pigmento visual que necesitan para su función. Mientras los FRs rabdoméricos aumentan su superficie celular mediante pliegues de la superficie de la membrana apical formando *microvilli*, en los FRs ciliares hay un único cilio cuya superficie contiene múltiples pliegues (Eakin, 1968; Eakin, 1982; Arendt et al., 2003, Figura ). Los FRs rabdoméricos expresan típicamente opsinas rabdoméricas (las opsinas son fopigmentos del grupo de las proteínas receptoras acopladas a proteína G (GPCRs) que se unen covalentemente a un cromóforo de tipo retinal para formar un complejo que desencadena la cascada de fototransducción) y los FRs ciliares expresan típicamente opsinas

ciliares, aunque ambos pueden expresar simultáneamente otros tipos de opsinas (Arendt and Wittbrodt, 2001). La expresión de uno u otro tipo de opsinas en cada tipo de célula fotorreceptora, determina la cascada de señalización, siendo diferente en ambos tipos de fotorreceptores. Además, los genes involucrados en el proceso de especificación y diferenciación de ambos tipos de fotorreceptores también difieren (Arendt, 2003).

En cuanto a la cascada de señalización en ambos tipos de FRs, las opsinas se asocian con la subunidad alfa de la proteína G ( $G\alpha$ ). Sin embargo, tanto el tipo de proteína G como el resto de moléculas involucradas en la señalización son diferentes para ambos fotorreceptores (ver Figura 1, Fain et al., 2010). Además, mientras que en los FRs rabdoméricos la cascada de señalización culmina con la apertura de canales TRP, produciendo una despolarización de la membrana, en el caso de los FRs ciliares se produce el cierre de los canales CNG (*cyclic nucleotide gated*) lo que causa una hiperpolarización de la membrana (Fain et al., 2010).

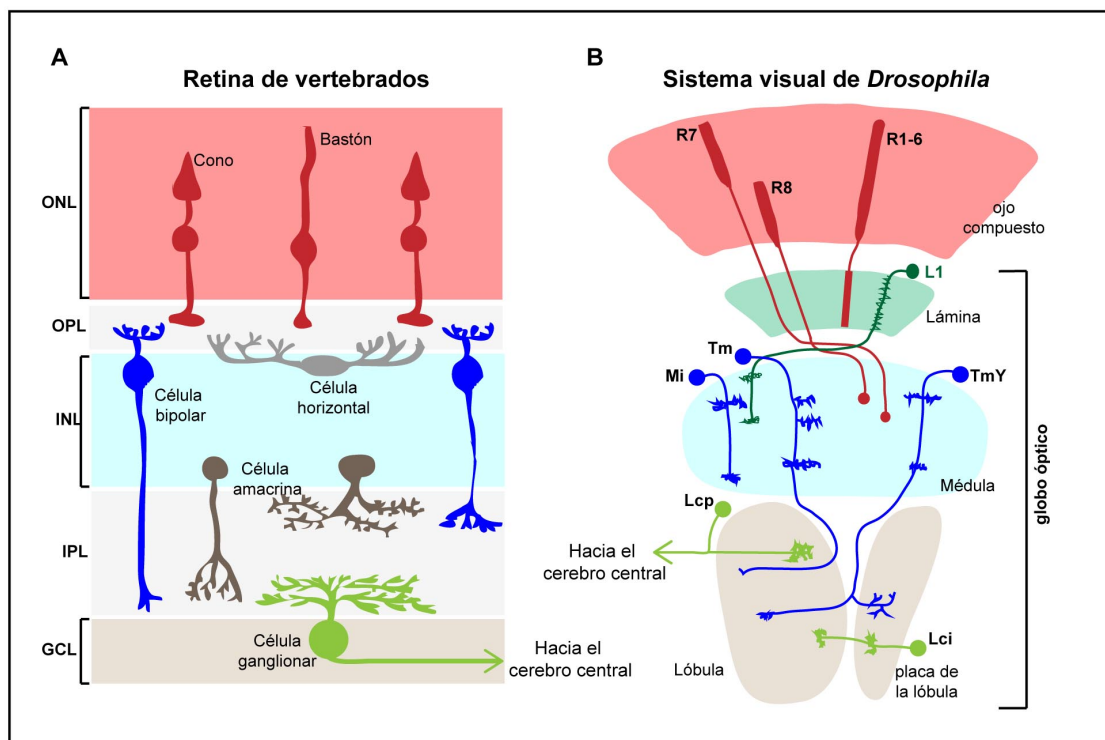


**Figura 1. Morfología y cascada de señalización de los fotorreceptores rabdoméricos y ciliares.** Representación esquemática de las células fotorreceptoras rabdoméricas (A) y ciliares (B) con los componentes esenciales de sus respectivas cascadas de fototransducción. Los FRs rabdoméricos (A) presentan un incremento de su superficie de membrana gracias a los pliegues de su membrana apical que forman microvilli, mientras que los FRs ciliares (B) incrementan su superficie de membrana mediante múltiples pliegues en la membrana de su único cilio. Opsinas rabdoméricas (*r*, naranja), opsinas ciliares (*rx*, naranja), subunidades  $G\alpha$  (violeta), arrestina  $\alpha$  y  $\beta$  (marrón), rodopsina quinas (magenta). PLC: fosfolipasa C, cGMP: guanosin monofosfato cíclico, PDE: fosfodiesterasa, GTP: guanosin trifosfato, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,3,4 trifosfato, PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5 bifosfato. Imagen adaptada de Detlev Arendt (Arendt, 2003)

**La hipótesis 1** plantea que a partir de estos fotorreceptores rabdoméricos (presentes en los insectos y otros invertebrados) se habrían originado las células ganglionares de la retina (RGCs) de vertebrados, dado que ambos tipos celulares requieren la actividad de factores de transcripción comunes, como Pax6/eyeless, Math5/atonal y BarH/barH1, además de expresar fotopigmentos relacionados (melanopsin/r-opsin) y emplear cascadas de fototransducción similares a partir de estas opsinas (Arendt et al., 2002; Frankfort and Mardon, 2002; Hsiung and Moses, 2002). Adicionalmente, ambos tipos celulares (FRs rabdoméricos y RGCs) son los primeros en ser generados por la ola de diferenciación inducida por Hedgehog (Pichaud et al., 2001). Posteriormente, las células amacrinas y horizontales de la retina de vertebrados podrían haber evolucionado de los fotorreceptores rabdoméricos (coincidiendo en la expresión del gen Prox1/pros). Las células bipolares, podrían haberse generado a partir de fotorreceptores ciliares, ya que comparten varias similitudes estructurales y moleculares (Arendt, 2003; Lamb et al., 2007; Viczian et al., 2003). De este modo la retina de vertebrados habría evolucionado tras sucesivas etapas, primero con una capa de fotorreceptores ciliares que harían su sinapsis directamente con las células ganglionares y subsecuentemente cada tipo celular se habría diversificado para dar lugar a las células bipolares, amacrinas y horizontales que se habrían intercalado entre los fotorreceptores y las células ganglionares para una mejora en el procesamiento de la información visual. Existe un organismo cohordado primitivo, la anguila del limo (*Myrine glutinosa*), cuya retina presenta fotorreceptores que hacen sinapsis directamente sobre las células ganglionares (Lamb et al., 2007), apoyando, por tanto, el modelo descrito.

**La hipótesis 2**, por otra parte, propone que tanto la retina de vertebrados, así como el sistema visual de *Drosophila* (i.e. retina + OL), habrían evolucionado de un ojo ancestral común que ya estaba formado por fotorreceptores y sus neuronas diana. Este modelo está basado en la evidencia que sugiere que las interneuronas de primer y segundo orden localizadas en la retina de vertebrados y en el OL de *Drosophila* están relacionadas desde un punto de vista evolutivo y genético (Erclik et al., 2009; Hartenstein and Reh, 2002). Las homologías de los tipos celulares, son las siguientes:

1. Las células bipolares de la retina de vertebrados serían homólogas a las neuronas transmedulares (Tm) del globo óptico. Ambos tipos celulares sirven de puente para la información visual y establecen sinapsis con los PRs y las proyecciones neuronales que conectan con el cerebro. Ambas presentan similitudes en cuanto a la expresión génica de genes homeóticos (Chx10/dVsx y Lhx(3/4)/apterous) durante su desarrollo y en el adulto.
2. Las células ganglionares serían homólogas a las proyecciones de las neuronas del complejo de la lóbula. Ambas reciben la información directamente a través de la sinapsis de neuronas diana de los fotorreceptores y la proyectan a los centros de procesamiento visual de orden superior en el cerebro. Ambas expresan también proteínas como Math5/atonal y Brn3b/ACJ6 durante su desarrollo (Erclik et al., 2008; Mu and Klein, 2004).



**Figura 2. Retina de vertebrados vs. sistema visual de *Drosophila*.** Esquema de Erclik modificado en el cual se muestran la estructura estratificada de la retina de vertebrados en comparación con la estructura del sistema visual de *Drosophila*, incluyendo en este último, tanto la retina como los diferentes ganglios del globo óptico, dándole así un aspecto también estratificado. Los colores muestran la hipotética relación evolutiva entre las capas de los dos sistemas visuales, como predice la hipótesis 2 de Erclik y colaboradores (Erclik et al., 2009). Cada color marca la homología de cada uno de los distintos tipos celulares entre ambos sistemas visuales. Se ha simplificado el número de tipos celulares para una mayor comprensión. ONL (outer nuclear layer), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer), IPL (inner plexiform layer), GCL (ganglion cell layer). R1-6 (outer photoreceptors), R7 y R8 (inner photoreceptors), L1 (lamina monopolar neuron 1), Tm y TmY (transmedullary neurons), Mi (medulla intrinsic neuron), Lcp (lobula complex projection neuron), Lci (lobula complex intrinsic neuron).

3. Las células progenitoras de la retina serían homólogas a las células progenitoras del globo óptico externo (OPC). Ambos tipos de progenitores requieren los genes CHX10/dVsx para su proliferación, primero de una forma simétrica y posteriormente cambian a una división asimétrica para generar las neuronas diana de los fotorreceptores (en el OPC ha sido descrito al menos para la formación de NBs de la médula) (Egger et al., 2007; Livesey and Cepko, 2001). Sin embargo, los progenitores del OPC no dan lugar a los fotorreceptores del ojo compuesto ni a las neuronas del complejo de la lóbula, como ocurre en el caso de la retina de vertebrados donde el primordio de la retina neural origina todos los tipos celulares de la retina.

Si bien, la hipótesis 1 propone que los diferentes tipos celulares se habrían originado a partir de dos poblaciones diferentes de fotorreceptores, esto no excluye la posibilidad de que ambos fotorreceptores co-existieran en un ojo ancestral común. Así, se podría plantear una tercera hipótesis en la que se podrían combinar y unificar las dos hipótesis anteriormente descritas. Esta **hipótesis 3** propone que el ojo de vertebrados podría haber evolucionado de un ojo ancestral común (simple) en el que estarían presentes tanto los fotorreceptores rabdoméricos como los fotorreceptores ciliares. Este ojo basal con dos tipos de receptores habría evolucionado, originando el resto de las neuronas de la retina del ojo actual. Así como plantea la hipótesis 1, las células ganglionares habrían evolucionado (descrito en hipótesis 1) desde los FRs rabdoméricos, así como las células amacrinas y horizontales. Las células bipolares se habrían originado a partir de los FRs ciliares. Evidencias que apoyan esta teoría, aparte de las comunes contenidas en las hipótesis 1 y 2 son:

- (i) No se han encontrado ningún fotorreceptor de tipo intermedio entre los FRs rabdoméricos (FRs-R) y los FRs ciliares (FRs-C) que apoye la idea de un ojo ancestral común con un único tipo de fotorreceptor intermedio que diera lugar posteriormente a ambos tipos de células fotorreceptoras (rabdoméricas y ciliares). Sin embargo,
- (ii) Existen animales en los que ambos tipos de ojos, ojos con fotorreceptores rabdoméricos y ojos con fotorreceptores ciliares, co-existen, como es el caso de la larva ciliada de los Lophotrochozoa, los Ecdysozoa (insectos)

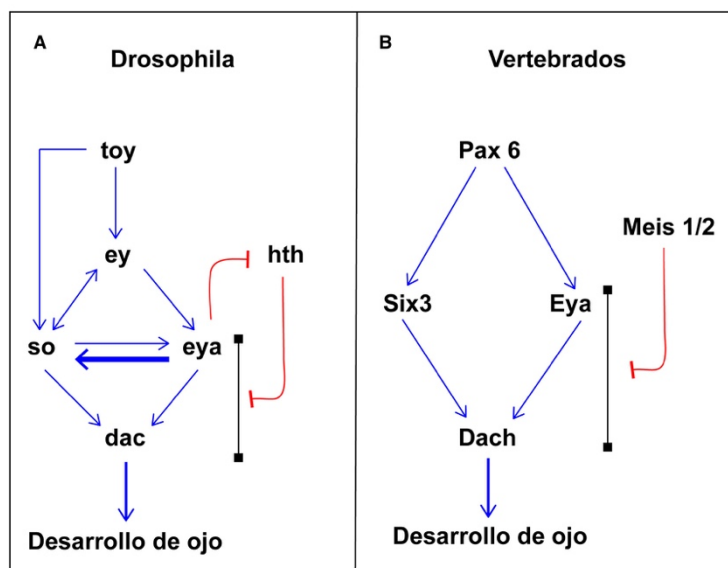
y Deuterostomados (e.g. el anfibio *Branchiostoma*, el poliqueto *Platynereis*) (Arendt y Wittbrodt, 2001).

- (iii) La divergencia evolutiva de las opsinas rabdoméricas y ciliares hace improbable que los fotorreceptores ciliares actualmente presentes en vertebrados y los fotorreceptores rabdoméricos presentes en invertebrados se hayan originado a partir de un fotorreceptor común en la base e los organismos bilaterales (Arendt y Wittbrodt, 2001).
- (iv) Las homologías entre las neuronas de la retina de vertebrados y las neuronas del globo óptico de *Drosophila* apoyan también esta teoría. Así mientras en vertebrados una vez originados los 7 tipos celulares de la retina en un ojo con ambos tipos de FRs, los FRs rabdoméricos se habrían perdido a lo largo de la evolución, en el caso de los ojos de insectos los FRs que se habrían perdido serían los FRs ciliares. Explicandose así el origen de dichas homologías.

En este trabajo, dadas las hipótesis 1, 2 y 3, se plantea la hipótesis 3 como la más plausible. No obstante, quedan muchos datos moleculares que aportar para poder proponer una teoría del origen evolutivo del ojo que no sea cuestionable. Con este trabajo, se pretende investigar más a fondo la hipótesis 3. Por tanto, si tanto el ojo de *Drosophila* (incluyendo retina y OL) como el ojo de vertebrados se originaron en un ojo común ancestral, cabría esperar que se encontraran homologías entre los genes que especifican ambos tipos de ojo. La retina de *Drosophila* contiene fotorreceptores y células accesorias mientras que la retina de vertebrados contiene no sólo los FRs sino también las neuronas que procesan la información visual. Estas neuronas se encuentran, en *Drosophila*, contenidas en los OLs. Sin embargo, la mayor parte de estudios en *Drosophila* sobre los genes conservados en el desarrollo del ojo se han llevado a cabo en el disco de ojo, el primordio que da lugar a los fotorreceptores y células accesorias y no al resto de neuronas de los OLs. Estos genes, conocidos como genes de especificación de retina (RDGs) están altamente conservados evolutivamente desde invertebrados a vertebrados (Gehring, 2005). Sin



embargo, no se sabe si esta red génica participa en la especificación del primordio de los OLs. Según la hipótesis 3 y lo anteriormente descrito, se podría hipotetizar que estos RDGs también participarían en la especificación de los OLs, de forma que el completo tanto el sistema visual de *Drosophila* como el de vertebrados compartirían una misma red génica, dando sentido a las homologías encontradas entre las neuronas que procesan la información visual en ambos y, por tanto, apoyando nuestra hipótesis 3.



**Figura 3. Red génica del desarrollo de ojo.** Los genes están dispuestos en orden jerárquico conforme a la cascada de activación, de arriba hacia abajo, las flechas azules indican interacciones positivas y las líneas rojas indican interacciones negativas. (A) Versión simplificada de la red génica reguladora del desarrollo de ojo en *Drosophila*. A la derecha, en B, la versión simplificada de la red génica reguladora del desarrollo de ojo en vertebrados, con los homólogos correspondientes al panel A Pax6/ey/toy, Six3/so, Eya/eya, Dach/dac y Meis 1/2/hth. ey: eyeless; toy: twin of eyeless; so: sine oculis; eya: eyes absent; dac: dachshund; hth: homothorax

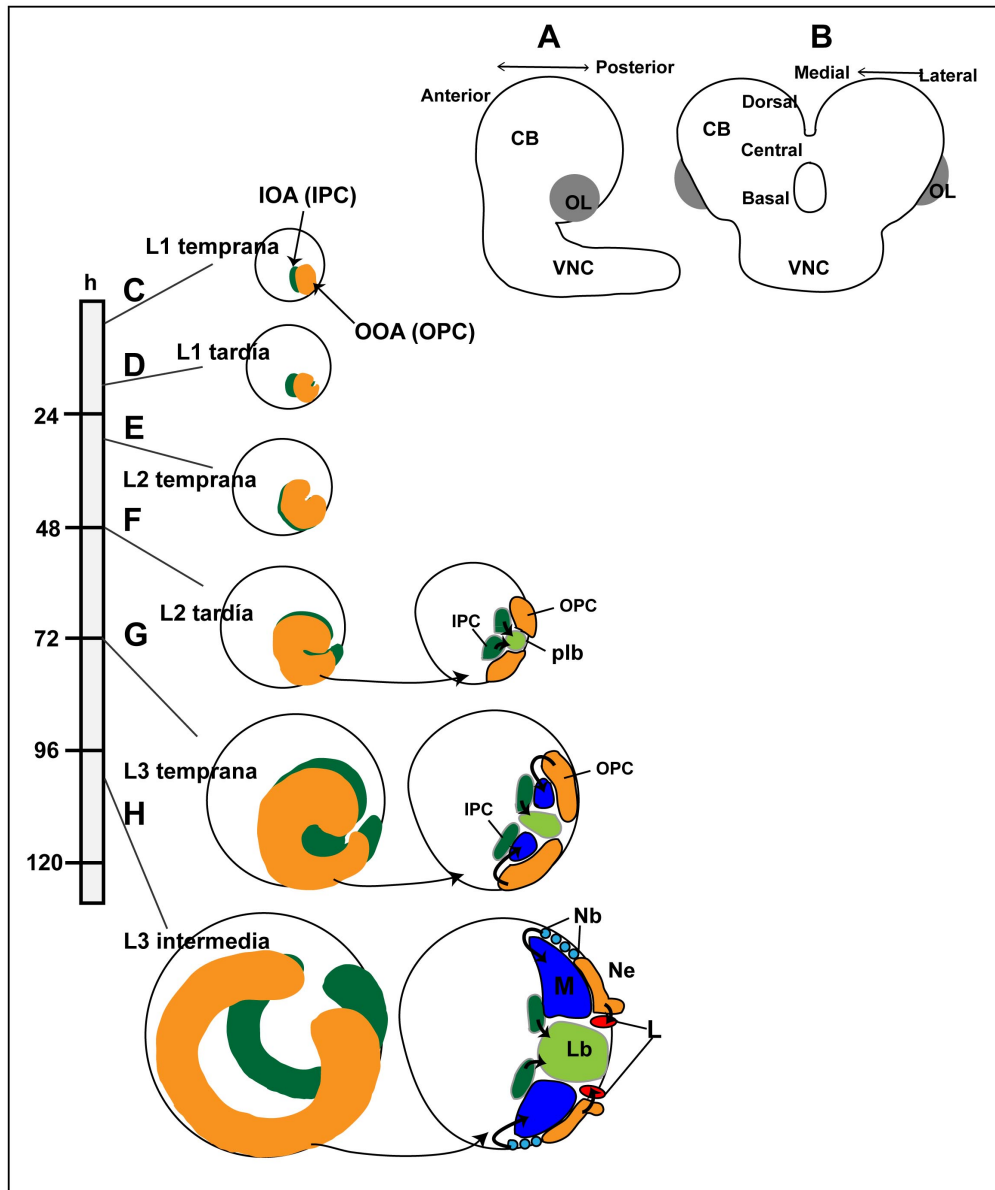
Hasta ahora la mayor parte de los trabajos publicados sobre el desarrollo de OLs han sido enfocados hacia la formación de la médula (Morante et al., 2011; Li et al., 2013; Yasugi et al., 2008; Orihara-Ono et al., 2011; Wang et al., 2011; Kawamori et al., 2011; ver también revisión Sato et al., 2013). Probablemente, la médula haya acaparado más atención como sistema modelo debido a que el desarrollo de la médula está basado en la producción de neuroblastos (NBs) y en su diferenciación en distintos tipos de neuronas medulares y glía. Esta similitud con el desarrollo del SN de vertebrados, junto a la importancia del estudio de la neurogénesis y la autorenovación de células multipotentes (NBs) en el SNC, hace del estudio del desarrollo de la médula, en *Drosophila*, un buen sistema modelo para el estudio de la neurogénesis. Además, a diferencia de lo que ocurre en el ectodermo, en la médula, la transición entre las células del neuroepitelio (Ne) y la formación de los NBs y su consiguiente diferenciación ocurren de una forma sincronizada y ordenada, facilitando el análisis y los resultados de los estudios realizados. (indicar el por qué e incluir REFS recientes).



Sin embargo, el primer ganglio que recibe los axones de los fotorreceptores es la lámina, cuya formación es dependiente de la llegada de axones (Selleck and Steller, 1991; Huang and Kunes, 1996) a través del tallo óptico que los une. Además, ya ha sido propuesto que los genes de determinación de la retina, como el *Six2 sine oculis (so)* es requerido también para el desarrollo de la lámina, dado que mutantes *so* presentan una lámina muy reducida (Fischbach and Technau, 1984). Este fenotipo también se ha observado en mutantes *eya/Eya1*. No obstante, estos experimentos no son concluyentes: dado que el desarrollo de la lámina depende de su inervación por la retina, y teniendo en cuenta que los mutantes *so* no desarrollan el ojo, la reducción de la lámina podría ser la consecuencia indirecta de la ausencia de ojo. A pesar de que ha sido demostrado que genes de especificación de la retina, como *so*, *eya* o *dac* se expresan en el OPC durante el desarrollo del OL (Cheyette et al., 1994; Bonini et al., 1998; Halder et al., 1998), no se ha hecho un estudio sobre la existencia de un posible efecto autónomo celular de estos genes durante el desarrollo de la lámina.

Con todas estas premisas, nos planteamos en este trabajo caracterizar los patrones de expresión de los genes de la red conservada de especificación del ojo: *ey/toy/ Pax6*, *eya/Eya1*, *so/Six2*, *dac/Dach*, *hth/Meis*, así como de las vías de señalización más importantes durante el desarrollo de ojo, como son *Hh/Shh*, *Dpp/BMP4* y *Wg/Wnt*. Una vez bien caracterizados los patrones de expresión, conocidos para algunos de estos genes (*eya/so*) (Cheyette et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994; Bonini et al., 1998) durante los estadíos larvarios de *Drosophila*, nos propusimos estudiar las interacciones entre ellos y el requerimiento de cada uno de estos genes en el desarrollo de la lámina. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos.

## 2. Morfología y desarrollo del globo óptico.



**Figura 4. Fases del desarrollo larvario de los hemisferios cerebrales y los OLs adyacentes de *Drosophila*.** A la derecha, en A una vista lateral del sistema nervioso de la larva en el que puede observarse la organización de la región del globo óptico (OL) con respecto al hemisferio cerebral (CB) y al cordón nervioso ventral (VNC) y se distingue el lado anterior del lado posterior. B, vista anterior de la misma estructura, indicando las posiciones medial y lateral. A la izquierda, esquema adaptado de Claude Nassif (C. Nassif et al., 2003), mostrando los estadios larvarios de un hemisferio cerebral, resaltando la región del OL. El eje del tiempo (en horas tras la eclosión a 22-25°C) se muestra a la izquierda. La columna de en medio muestra la vista lateral esquemática de los hemisferios cerebrales de los estadios indicados. La columna de la derecha muestra las secciones esquemáticas de los hemisferios cerebrales (L2 tardía, L3 temprana y L3). Los cerebros están dibujados a escala para indicar el incremento de tamaño durante el período larvario, datos basados en estudios de 6 larvas por cada estadio (C. Nassif et al., 2003). En estas imágenes pueden observarse los cambios morfogenéticos en el globo óptico (IOA, *inner anlage*; en verde; OOA, *outer anlage*; en amarillo) que sirven para poder definir los estadios. C: L1 temprana; IOA y OOA forman placas verticales. D: L1 tardía; el OOA adopta una forma creciente. E: L2 temprana; Tanto el IOA como el OOA adoptan una forma creciente. F: L2 tardía; el IOA produce un grupo de neuronas (plb) que forman el primordio temprano del complejo de la lábula (Lb). G: L3 temprana; El OOA comienza a producir el primordio de la medula (Me) desde su margen medial. H: L3 intermedia-tardía; el primordio de la medula ya ha crecido, y el primordio de la lamina (la) se forma en el margen lateral del OOA. Aquí se entiende como primordio cuando ya está diferenciado el tejido. Ne, parte epitelial del OOA; NB, neuroblastos formados en los márgenes del OOA. Barra de escala = 50µm.

Para la correcta interpretación de los resultados mostrados en este capítulo, es esencial conocer la morfología de los GOs a lo largo del desarrollo. El ritmo del desarrollo larvario en *Drosophila* depende en gran medida, y entre otros factores, de la temperatura, pudiendo variar, por tanto, en su duración. Para poder definir el estado de desarrollo del globo óptico con respecto al tiempo, tomaremos como referencia la temperatura a la que se realizaron la mayoría de los experimentos y a la cual fueron sometidas las larvas del estudio. Esta temperatura ronda entre los 25 (temperatura óptima de desarrollo) y 29°C.

Como ha sido descrito anteriormente (ver introducción general), en el cerebro adulto de *Drosophila*, el globo óptico constituye la mayor parte del protocerebro, tanto en volumen como en número de células. En las fases tempranas del desarrollo larvario el crecimiento del globo óptico no es tan acusado con respecto al cerebro central, junto al cuál conforma cada uno de los dos hemisferios cerebrales. Durante la segunda mitad de la vida de la larva, la mayor parte del crecimiento de los hemisferios cerebrales se debe a la proliferación que tiene lugar en los globos ópticos, los cuales, al llegar la metamorfosis, ya ocupan completamente la mitad lateral de cada hemisferio cerebral.

Las neuronas del globo óptico y los compartimentos generados por ellas (lamina, medula, y complejo de la lóbula) tienen su origen en dos placas epiteliales neuroectodermales llamadas primordio óptico interno (IOA, *inner optic anlage*) y primordio óptico externo (OOA, *outer optic anlage*), que se especifican ya durante el estadio embrionario, y una vez invaginados, quedan unidos a la superficie posterior basal del cerebro (ver Figura 4). Durante los estadios larvarios el IOA y el OOA también son conocidos como IPC (*inner proliferative center*) y OPC (*outer proliferative center*), respectivamente. Hacia el final del primer estadio larvario (L1) (12-24 horas desde a eclosión de la larva, ALE), el OPC comienza a curvarse y adopta una forma creciente o de herradura, con la abertura de la herradura hacia el lado posterior (Figura 4A).

Durante la primera mitad del segundo estadio larvario (24-36 horas AEL), el IPC continúa este cambio de forma, y ambas estructuras aumentan su área de superficie. La última etapa del segundo estadio larvario (L2) (36-48 horas ALE) se caracteriza por la aparición de un grupo de neuronas que rellena el espacio

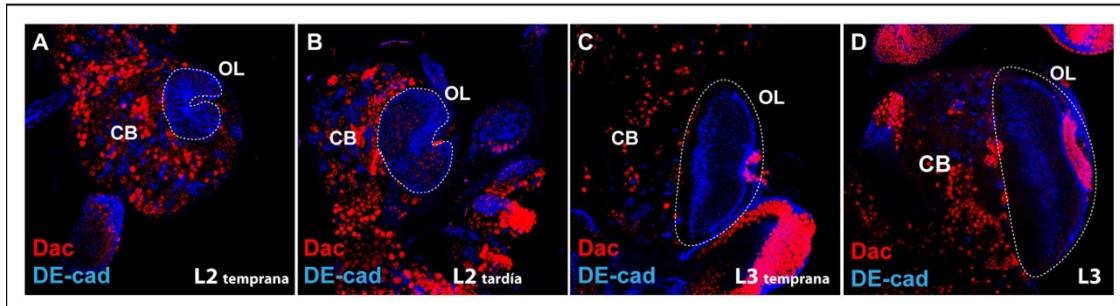
central entre el IPC y el OPC. Este grupo de neuronas está formado por el IPC y representa el primordio del complejo de la lóbula (plb) (Figura 4G). Durante la fase temprana del tercer estadio larvario (L3) (48-72 horas ALE), el área superficial medial, las células se dividen simétricamente formando neuroblastos (NBs). Estos NBs empujan a su progenie centrípetamente (por división asimétrica) entre el OPC y el IPC, de manera que este anillo de neuronas formarán el primordio de la médula externa (Figura 4G y Figura 4H, en azul).

En el margen lateral las células epiteliales del OPC generan un anillo de células proneurales envuelto alrededor del plb, este anillo constituye el primordio de la lámina (Figura 4H, en rojo). A medida que el primordio de la lámina, así como el de la médula, aumentan su volumen, expanden el diámetro del OPC. Hacia mitad del tercer estadio larvario (72-96 horas ALE), el OPC iguala en diámetro al hemisferio cerebral (cerebro central). Es en este momento, cuando aproximadamente la mitad del OPC está formado en su lado medial por NBs y en su lado lateral por células precursoras de la lámina (LPCs), quedando una franja central de células epiteliales, que hacia el final de L3 se estrecha y queda entre el primordio de la lámina y el primordio de la médula externa: es el remanente del OPC.

### **3. Descripción de los patrones de los genes utilizados como marcadores del OL y la lámina durante el desarrollo larvario del globo óptico de *Drosophila*.**

Previamente al estudio de genes y redes génicas involucradas en el desarrollo del globo óptico, describiré una serie de marcadores importantes que ayudarán a la comprensión de las imágenes, resultando por tanto necesario hacer una descripción de los mismos. Estos marcadores<sup>7</sup> aparecerán durante gran parte de este trabajo para facilitar la interpretación tanto de la morfología y orientación del OL, como de la localización de la lámina en cada una de las imágenes mostradas. Uno de estos marcadores es DE-cad, (**Drosophila E**-cadherina) codificada por el gen *shotgun* (Nüsslein-Volhard et al., 1984; Tepass et al., 1996) una proteína de membrana que participa en la adhesión de las células epiteliales (uniones de adherencia subapical (Oda et al., 1994)) y que se

expresa fuertemente en el neuroepitelio, tanto interior (IOA/IPC) como exterior (OOA/OPC). La detección de DE-cad con un anticuerpo específico combinada con inmunofluorescencia indirecta nos permite no sólo identificar la morfología y orientación del OL en cada imagen, sino que también nos permite establecer el estadio del desarrollo que estamos observando (ver Figura 5).

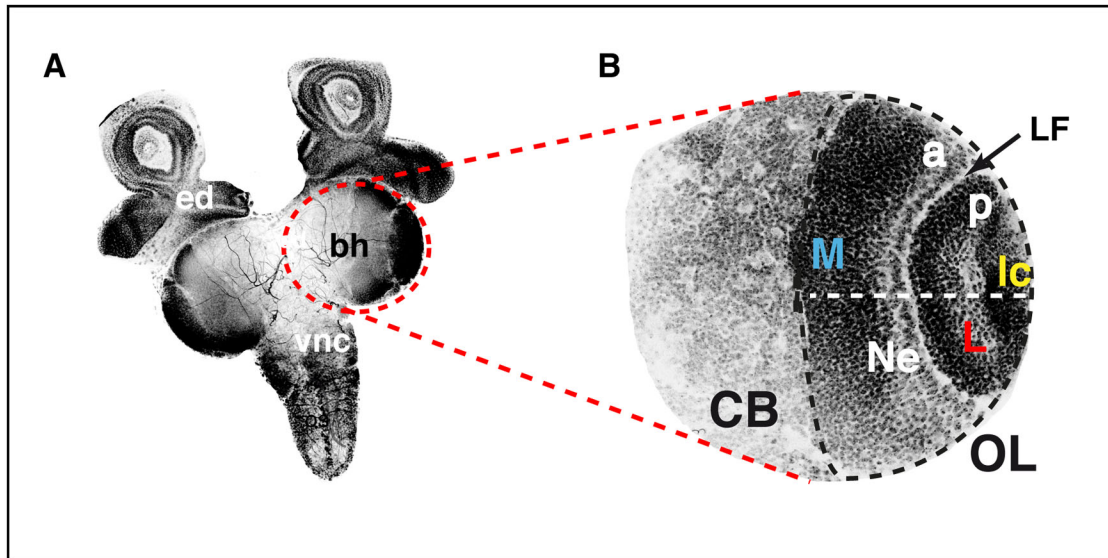


**Figura 5. Imágenes de microscopía confocal mostrando los patrones de expresión de dac (rojo) y DE-cad (azul) en el OL durante diferentes etapas del desarrollo larvario.** La región punteada corresponde a la localización del OL. (A) DE-cad marca el neuroepitelio desde la fase temprana del estadio larvario 2. (B) En la fase tardía de L2 y comenzando L3 (C), puede observarse como comienzan a aparecer células dac+, indicando el comienzo de la diferenciación de la lámina. (D) Hacia mitad de L3 la región del OL alcanza unas dimensiones casi comparables a la región del CB y se observa un mayor número de células de la lámina que han comenzado su diferenciación y expresan el primer marcador de diferenciación, Dac. OL: globo óptico; CB: cerebro central; L2 y L3: estadio larvario 2 y 3, respectivamente.

Para la localización de la lámina, Dac es un buen marcador, puesto que el gen *dachshund* (*dac*) se expresa en las neuronas de la lámina (Mardon et al., 1994; Huang and Kunes, 1996). Así mismo puede ser utilizado como un marcador del inicio de la diferenciación de las neuronas de la lámina (Mardon et al., 1994; Huang and Kunes, 1996; Chotard et al., 2005).

#### 4. Orientación del globo óptico.

Para la mayoría de las imágenes que se muestran en este trabajo se ha utilizado una vista ventral del globo óptico (las preparaciones se realizaron colocando el cordón ventral hacia el cubreobjetos), siendo la orientación utilizada la que se observa en la Figura 6, salvo que se indique lo contrario. En la orientación que se utiliza, la lámina queda hacia la derecha (lado lateral) y la médula y cerebro central hacia la izquierda (lado medial).



**Figura 6. Orientación del OL en las figuras.** (A) CNS de una larva L3 teñida para el marcador nuclear DAPI. El sistema nervioso central está compuesto del cordón nervioso ventral (vnc) y de los hemisferios cerebrales (bh). Los discos de ojo (ed) se encuentran directamente encima de los hemisferios cerebrales. En (B), una vista de la superficie del hemisferio cerebral derecho a mayor magnificación. CB: cerebro central; M: médula; Ne: neuroepitelio; L: lámina; lc: complejo de la lóbula; a: anterior al LF; p: posterior al LF; flecha: surco de la lámina (LF). La región del OL aparece delimitada por una línea discontinua negra. La línea discontinua blanca indica la posición aproximada de las secciones mostradas en los apartados 2 y 5 de este capítulo (**Figura 15** y **Figura 25**).

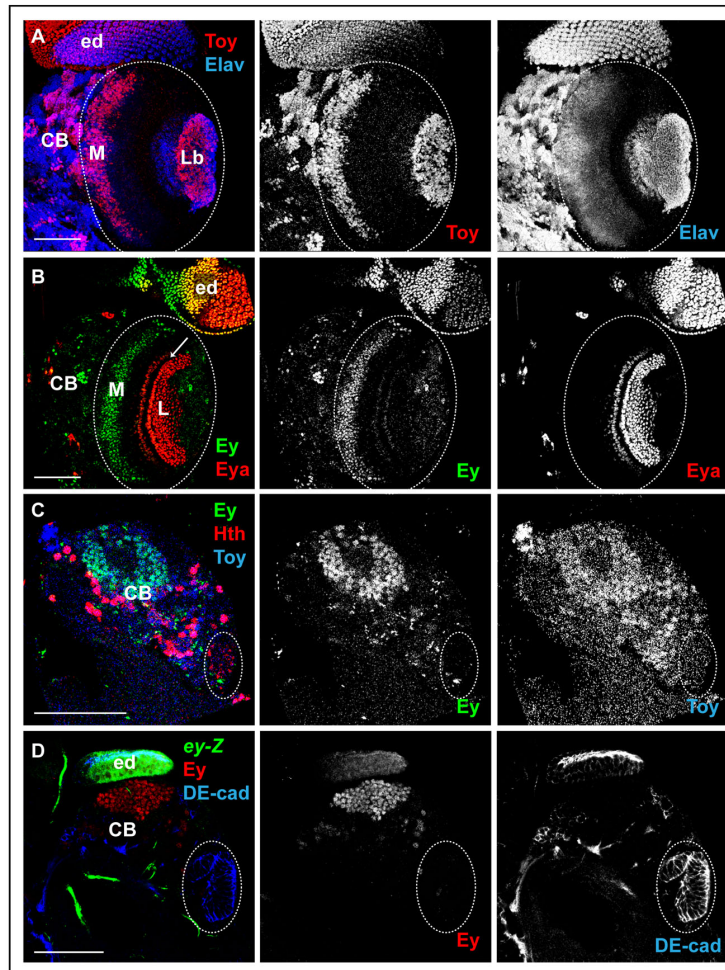
## RESULTADOS

### 1. Patrón de expresión de los genes Pax6 (ey/toy).

En *Drosophila* hay dos genes homólogos Pax6, *eyeless* (*ey*) y *twin of eyeless* (*toy*), los cuales como ya ha sido descrito, encabezan la cascada de factores de transcripción que controlan el desarrollo del ojo. Ambos genes, que ya especifican el primordio de ojo durante el desarrollo embrionario (Ver introducción general y Figura 3) vuelven a expresarse durante el desarrollo larvario, siendo los primeros en hacerlo y especificar la región del disco de ojo-antena a partir de la cual se desarrollará la retina del ojo compuesto. Posteriormente, durante L2 inducen la expresión de los genes de determinación de retina (RDG) *eya*, *so* y *dac* (Kenyon et al., 2003; Kumar and Moses, 2001). Ambos genes, además, son capaces de inducir la formación de ojo cuando son expresados de forma ectópica durante el desarrollo de la mosca (Halder et al., 1995; Czenry et al., 1999).

Dado que *ey* y *toy* son los genes que activan *eya* y *so* en el disco de ojo para especificar las células de la retina y su alto grado de conservación evolutiva para el desarrollo de ojo (ver introducción general), son los primeros genes candidatos para analizar su expresión en los OLs y estudiar su posible implicación durante el desarrollo de la lámina. Sin embargo, a pesar de ser conocidos como "Master genes" en el desarrollo de ojo, su expresión no se encontró en células progenitoras del globo óptico (OPC). *ey* y *toy* se expresan, sin embargo, a lo largo del estadio larvario en la región de la médula (Figura 7A y Figura 7B), y en el caso de *ey*, se sabe que se expresa tanto en NBs de la medula como en ciertas neuronas que forman finalmente la médula, donde tiene una función relacionada con la migración de estas neuronas y su diferenciación (Morante et al., 2011; Li et al., 2013). *toy* además se expresa en las células del complejo de la lóbula (Figura 7B), pero ninguno de estos genes se expresa ni en el neuroepitelio (OPC), donde se originan los progenitores de ambos ganglios, lámina y médula, ni en las LPCs, así como tampoco en las células de la lámina (Figura 6).





**Figura 7. *ey* y *toy* se expresan en la médula de los OLs en L3.** La línea punteada marca la región del globo óptico. Se muestran tanto los canales combinados (izquierda) como los canales individuales (centro y derecha). (A, B) Vistas de la superficie del OL en fase tardía L3 teñidos para Toy y Elav (A) y para Ey y Eya (B). (A) *toy* se expresa tanto en la médula como en la lóbula, ésta última fácilmente distinguible gracias al marcador de diferenciación Elav. (B) *ey* se expresa únicamente en las células de la médula, *eya* permite delimitar la localización de los precursores de la lámina, así como de la propia lámina. (C, D) Vistas de la superficie del hemisferio cerebral completo en fase L1 y L1 tardía, respectivamente. Se tiñeron para Ey, Hth y Toy (C) y para  $\beta$ -galactosidasa (*ey-Z*), Ey y DE-cad (D). (C) Ni *ey* ni *toy* se observan en la región del OL, marcado por la presencia de Hth, pero si se observan en el primordio de los MBs. (D) Se utilizó DE-cad para marcar el neuroepitelio y constatar que, efectivamente, la región donde se expresan *ey* y *toy* no corresponde al primordio del OL sino al de los MBs, donde curiosamente, no se encontró la expresión de  $\beta$ -galactosidasa, la cual si aparece en el primordio de ojo. ed (disco imaginal de ojo); M (médula); L (lámina); Lb (complejo de la lóbula); CB (cerebro central). La barra inferior de los paneles de la izquierda indica una escala aproximada y relativa entre las imágenes.

La expresión de estos genes Pax6 también fue analizada en estadios larvarios tempranos para verificar que no se expresaban previamente para ser reprimidos más tarde, una vez que ya estuviera especificado el tejido. Tampoco se encontró una expresión vinculada al desarrollo de la lámina (Figura 7C y Figura 7D).

Si bien, se detecta un parche de células en el hemisferio cerebral de una larva L1 tardía con la expresión más o menos solapada de *ey/toy* (Figura 7C), este parche de expresión no corresponde a la región del primordio de globo óptico (OL) (marcada con una línea discontinua). Para cerciorarnos de que el parche no correspondía a la región del primordio del OL se realizó una tinción de una larva L2 temprana *ey-lacZ*, en la cual se utilizó anti-DE-cad para marcar la región del neuroepitelio. Como puede observarse en la Figura 7D, el parche

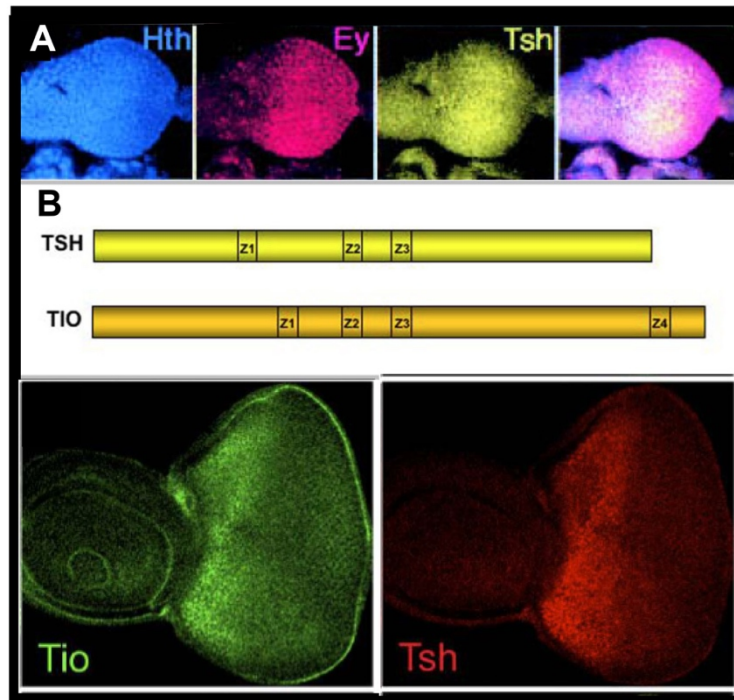


de células positivas marcadas con anti-Ey no corresponde a la región del neuroepitelio, sino a la región del cerebro, más concretamente a neuronas de los *mushroom bodies* (MBs). Esto no es de extrañar, pues se sabe que tanto *ey* como *toy* se expresan en las neuronas/NBs de los MBs durante estadios larvarios y ambos genes, junto al gen *dachshund* son esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de estas estructuras, implicadas en la memoria y el aprendizaje (Kurusu et al., 2000; Callaerts et al., 2001 y Furukubo-Tokunaga et al., 2009). En la Figura 7D se observa que la línea *ey-lacZ*, en este caso, no reproduce el patrón de *eyeless* en el cerebro (ausencia de verde (*ey-Z*) en el parche de células rojas (anti-Ey)), aunque sí parece ser un buen marcador de la expresión de este gen en el primordio de ojo (ED). Esto se debe a que la línea reportera se encuentra en un locus que obedece únicamente al *enhancer* del ED (línea E0.37-*lacZ*, Czenry et al., 1999).

**No se detectó la expresión de los genes tempranos *teashirt (tsh)* y *tiptop (tio)* en el primordio de OL durante su desarrollo larvario.**

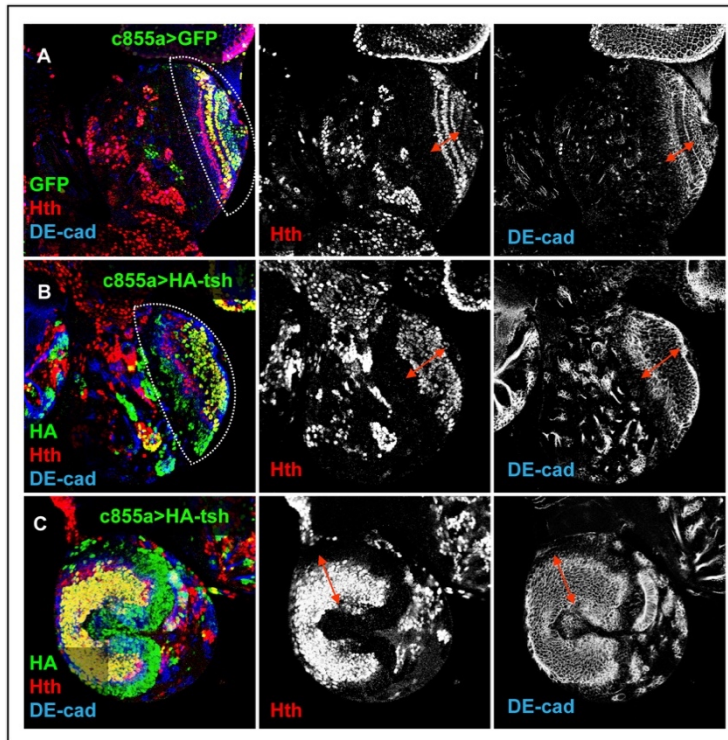
Otros genes tempranos de ojo son *teashirt (tsh)* y *tiptop (tio)*. *tsh* es un factor de transcripción que codifica para una proteína de unión a ADN con 3 dominios Zn-finger espaciados (Fasano et al., 1991). *tio* fue identificado en *Drosophila* como un parálogo de *tsh* (Laugier et al., 2005; Bessa et al., 2009). Al igual que *tsh*, *tio* pertenece a la familia de proteínas de unión al ADN, pero a diferencia de aquél, *tio* presenta 4 dominios Zn-finger (Fasano et al., 1991; Laurier et al., 2005; Datta et al., 2009).

Ambos genes se expresan de forma coincidente en el primordio de ojo durante el desarrollo larvario, de forma generalizada durante L1 y en la región anterior al MF en los estadios posteriores, una vez comenzada la diferenciación de la retina (Singh et al., 2002; Bessa et al., 2002). En la región anterior al MF *tsh* y *tio* se coexpresan con *ey* y *hth* en el dominio progenitor donde las células están indiferenciadas y proliferan asincrónicamente (Wolff and Ready, 1991; Pichaud and Casares 2000; Bessa et al., 2002). Además, *tsh* y *tio* se expresan en el dominio de células precursoras inmediatamente anterior al MF, donde se coexpresan con *ey*, pero no con *hth* (Bessa et al., 2002).



**Figura 8. Expresión de *tsh* y *tio* en el disco de ojo.** (A) Figura de José Bessa (Bessa et al., 2002), en la que se observa el patrón de expresión de *tsh* (amarillo) en larva L1. El primordio de ojo se encuentra en el lado derecho, quedando a la izquierda el primordio de antena. La expresión de *tsh* es generalizada en este estadio, así como ocurre con *ey* y *hth*. (B), Figura de Reha R. Datta (Datta et al., 2005), en la que se observan los dominios Zn-finger de *tsh*, así como de su parólogo *tio*, éste último con un dominio Zn-finger adicional. En C, D y E (Bessa et al., 2009) se observa (en verde) el patrón de expresión de *tsh*, el patrón de expresión de *tio* (rojo), así como la co-expresión de ambos (abajo) durante L3, tanto en disco de ojo-antena (C), como en el disco de ala (D) y de pata (E).

Se ha propuesto que *tsh* forma un complejo con *ey* y *hth* en las células progenitoras de ED donde tendría dos papeles fundamentales: promover la proliferación celular y prevenir la expresión prematura de factores de transcripción que actúan más tarde durante la diferenciación, como *eya*, *so* y *dac* (Bessa et al., 2002). Tanto *tsh* como *tio* son capaces de inducir la formación ectópica de ojos (Pan y Rubin, 1998; Bessa et al., 2009). No obstante, recientemente se ha comprobado que *tio* es más eficiente en la formación ectópica de ojos (Datta et al., 2009). Ambos genes se consideran redundantes, de manera que pueden sustituirse mutuamente durante el desarrollo de la retina. De hecho, cada gen regula negativamente la transcripción del otro, de forma que la represión de cualquiera de estos genes, resulta en una desrepresión de su parálogo compensando su déficit (Laugier et al., 2005; Bessa et al., 2009).



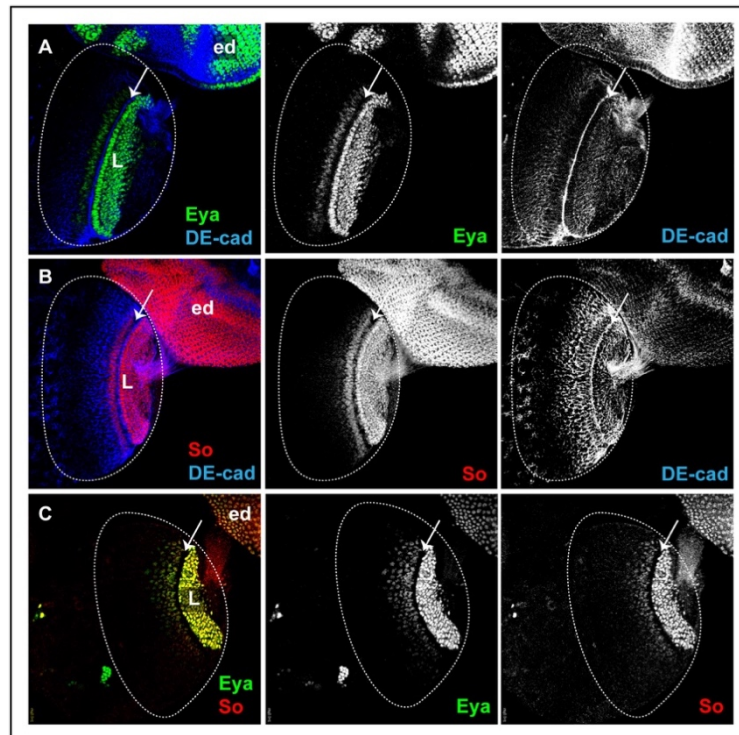
**Figura 9. La sobreexpresión de *tsh* en los OLs expande la región del neuroepitelio cuyas células expresan *hth*.** (A,C) La línea *c855a-Gal4* (Hrdlicka et al., 2000; Egger et al., 2007) se utilizó para dirigir la expresión de las construcciones UAS- en los centros proliferativos interno y externo. Los OLs en L3 que expresan tanto GFP (A) como *HA-tsh* (B,C) dirigida por *c855a-Gal4* fueron teñidos para Hth, DE-cad y HA. En C se muestra una vista lateral del OL. La expresión ectópica de *tsh* expande la región DE-cad+ que aparece densamente empaquetada y cuyas células expresan *hth* (flechas de doble punta). Los OLs en A y B están delimitados por la línea punteada

Dada la relevancia de ambos genes para el desarrollo temprano de retina, se estudiaron sus patrones de expresión en el desarrollo del OL. De nuevo, sorprendentemente, no se halló expresión alguna ni de *tsh*, ni de *tio* en el neuroepitelio del OPC (no mostrado). Sin embargo, cuando expresamos ectópicamente *tsh* en el neuroepitelio del OPC, encontramos que las células respondieron a la expresión de *tsh* estimulando la proliferación celular y bloqueando la diferenciación de la lámina (Figura 9 ). Por tanto, la expresión de *tsh* en el Ne, *hth*-positivo, al recapitular la coexpresión de ambos FT en la región progenitora del ojo resulta en una fuerte estimulación de la proliferación de las células del Ne, de forma equivalente a como lo hacen en el ED.

## 2. Patrones de expresión de *eyes absent* (*eya*), *sine oculis* (*so*) y *homothorax* (*hth*).

Tanto *eyes absent* (*eya*) como *sine oculis* (*so*) se expresan de una manera gradual en el disco de ojo (ED) en desarrollo, siendo estos niveles más altos en la parte posterior del disco desde L2 tardía (*eya*) y la fase temprana de L3 (*so*), en adelante (Bonini et al., 1993, 1997; Cheyette et al., 1994). Ambos genes, como ya se ha mencionado anteriormente, son inducidos por el gen temprano *eyeless*

(*ey*) (Halder et al., 1998; Niimi et al., 1999). Estos genes no sólo tienen patrones de expresión solapantes en el primordio de ojo de *Drosophila*, sino que, en mamíferos como el ratón, también se coexpresan en el primordio de ojo, así como en otros tejidos (Oliver et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Xu et al., 1997a, b). Además de expresarse durante el desarrollo del **ED**, *eya* se expresa y ejerce una función durante la formación de los ocelos (Brockmann et al., 2011) y está implicado en otros procesos del desarrollo tales como el desarrollo de las células somáticas precursoras de las gónadas (Bonini et al., 1993, 1997; Leiserson et al.,



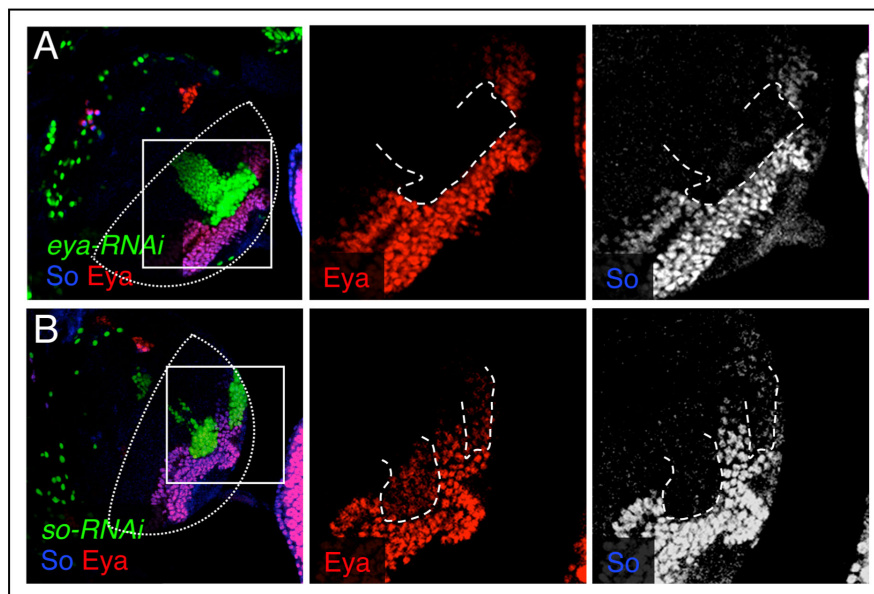
**Figura 10. *eya* y *so* se expresan en patrones indistinguibles en el OL.** Vistas de la superficie lateral del OL en fase tardía L3 teñido para *Eya* y DE-cad (A), *So* y DE-cad (B) y *Eya* y *So* (C). Se muestran tanto los canales combinados (izquierda) como los canales individuales (centro y derecha). La línea punteada marca la región del OL y la flecha indica la posición del LF. En (C) la zona de color rojo corresponde a una señal de fondo en el tallo óptico. Se puede observar como colocalizan las expresiones de ambos genes. L (lámina); ed (disco imaginal de ojo).

1994; Boyle et al., 1997; Pignoni et al., 1997). En el caso de *so*, es requerido para el desarrollo del sistema visual completo, incluyendo además del ojo compuesto, los ocelos, el globo óptico (invaginación durante estadio embrionario) y el ojo de la larva o Bolwig's organ (Cheyette et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994; Pignoni et al., 1997; Brockmann et al., 2011). Durante el desarrollo del globo óptico, ambos genes *eya* y *so* se expresan de una forma solapante desde un estadio temprano durante el desarrollo de la larva



(concretamente su expresión puede detectarse desde L2 tardía), antes de que comience la invasión de la lámina por los axones de los fotorreceptores (Ver Figura 12). Por lo tanto, preceden la expresión del marcador de neuronas de la lámina *dachshund* (*dac*). Durante L3 ambos genes se expresan en el neuroepitelio del OPC a unos niveles basales, siendo su expresión más fuerte conforme alcanzan el surco de la lámina (LF) y ya en la región de la lámina (Figura 12D). En el caso de *eya*, puede observarse cómo está delimitada su expresión en la región medial del Ne gracias al marcador proneural de la medula, *lethal of scute* (*l'sc*) (Egger et al., 2007; Yasugi et al., 2008) (Figura 15A).

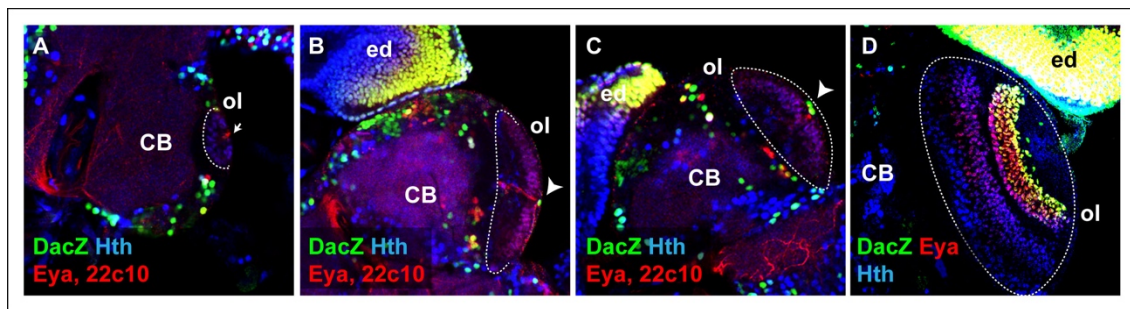
Al igual que ocurre durante el desarrollo del **ED** *eya/so* tienen patrones de expresión solapantes, comenzando su expresión en la zona indiferenciada (anterior al LF) y yendo en aumento conforme se expresan en la región diferenciada (posterior al LF). Dada la similitud de los patrones de expresión de *eya/so* cuando comparamos el **ED** y el globo óptico, nos planteamos si se cumple, también en este tejido, la relación descrita por Pignoni (Pignoni et al., 1997) entre estos dos genes, que propone que se regulan mutuamente, hecho que también se confirma en la región del primordio de los ocelos (Brockmann et al., 2011). Para averiguarlo se indujeron clones de pérdida de función mediante



**Figura 11. Dependencia mutua de la expresión de *eya* y *so*.** Los clones marcados con GFP expresan el RNAi-*eya* (A) o el RNAi-*so* (B). aA la derecha se muestran los canales de *eya* y *so* por separado, que corresponden a las regiones encuadradas. Los OLs aparecen delimitados por una línea punteada. (A, N=10) El knockdown de *eya* mediante RNAi reduce de manera muy eficiente la señal de *Eya* a niveles de fondo. En estos clones la señal de *So* desaparece. Los clones RNAi-*eya* se extienden hacia, pero no entran en la lámina. (B) El knockdown de *so* mediante RNAi reduce de manera muy eficiente la señal de *So* a niveles de fondo. En estos clones la señal de *Eya* es reducida, pero no llega a desaparecer.

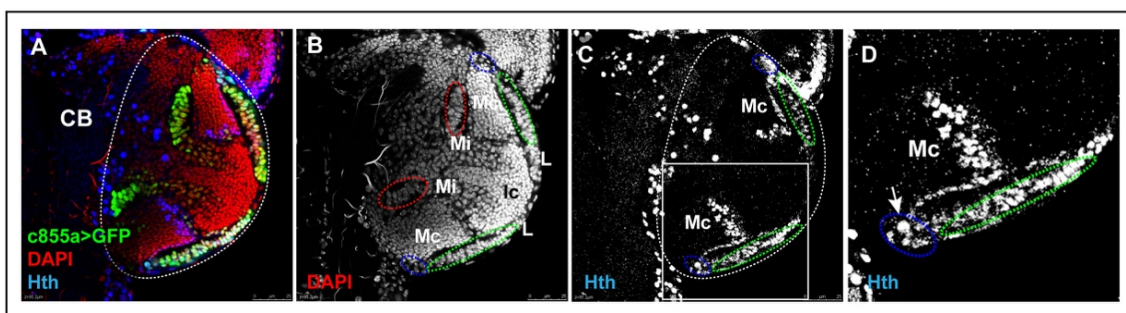
la atenuación de la expresión de *eya* y *so*, usando líneas ARNi específicas. Primero se analizó para cada gen cuál era el grado de atenuación (o “knock-down”) de su expresión, y se analizó el efecto de esta atenuación sobre el otro gen. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis: *eya* y *so* mantienen una mutua dependencia en cuanto a su expresión, siendo ésta más fuerte en el caso de *so*, puesto que cuando eliminamos *Eya*, los niveles de *So* son prácticamente nulos, pero cuando eliminamos *So*, los niveles de *Eya* disminuyen, pero son aún detectables a niveles basales (Figura 11). Este es el comportamiento observado en el ED (Pignoni et al., 1997).

En cuanto a ***homothorax (hth)***, su expresión en el **ED** de *Drosophila* se produce desde el primer estadio larvario del desarrollo (L1), al igual que *eyeless*, y posteriormente va quedando restringido, conforme avanza la onda de diferenciación, a la región anterior donde aún pueden distinguirse células indiferenciadas con capacidad proliferativa. Su expresión forma un gradiente cuyo pico máximo se encuentra en la región anterior y el mínimo coincide con la región donde comienzan a expresarse los genes RD, mostrando así patrones de expresión complementarios (Figura 14). Hacia el final de L3 el dominio de *hth* prácticamente desaparece y queda reemplazado por los fotorreceptores y demás células diferenciadas del **ED**. *hth* también se expresa en la membrana



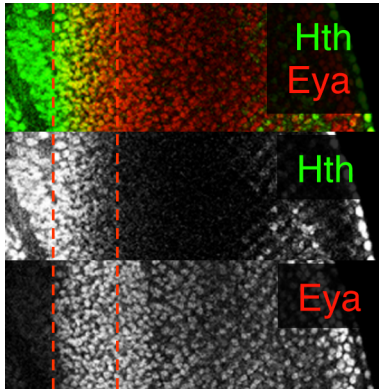
**Figura 12. Progreso de los patrones de expresión de *eya* y *hth* en el OL durante el desarrollo larvario.** (A-D) Imágenes del OL en sus diferentes estadios larvarios. La línea punteada delimita la región del OL. (A-C) Corresponden a imágenes de larvas *dac-Z* que se tiñeron con  $\beta$ -galactosidasa para seguir la expresión de *dac* y además se tiñeron para Hth, Eya y 22c10, éste último para detectar la presencia de los axones. En (A) se observa una larva L2 temprana donde se detecta la expresión temprana de Hth. Nótese que ésta es anterior a la llegada de los fotorreceptores de los axones de la retina (ver flecha). En (B) se muestra una larva L3 temprana, en la que se detectan tanto la expresión de Hth como de Eya y puede verse la presencia del primer axón de los fotorreceptores (en rojo). La punta de flecha marca la presencia de la primera neurona de la lámina que expresa el marcador de diferenciación *dac*, detectable por la presencia de  $\beta$ -galactosidasa. (C) Corresponde a una larva L3 ligeramente más tardía que la anterior, en la que ya podemos detectar la presencia de dos neuronas *dac+* (punta de flecha), y así sucesivamente hasta llegar a L3 tardía. (D) Imagen de una larva L3 en estadio intermedio-tardío, donde se observa el aumento del tamaño del ol, así como un mayor número de células precursoras de la lámina, marcadas por Eya y un mayor número de células en diferenciación *dac+*. ol: globo óptico; CB: cerebro central; ed: dico imaginal de ojo.

peripodial del **ED** (Bessa et al., 2002), así como, en la región ocelar (Brockmann et al., 2011). *hth* se expresa desde estadíos larvarios tempranos en el OL, como puede verse representado en la Figura 12 y Figura 7C, donde ya se expresa en el Ne (OPC) a comienzos de L2 y hacia el final de L2 siendo previo a la primera neurona de la lámina que aparece a comienzos de L3 (marcada en la figura 12B por la presencia de *dac*) lo que indica el comienzo de la diferenciación inducida por la llegada de los primeros axones, que se produce, una vez que ya se han diferenciado las primeras 4 filas de fotorreceptores.



**Figura 13. La expresión de *hth* no sólo se limita a los progenitores del OPC.** Vista de una sección-z confocal de un OL en fase tardía L3 de una larva *c855a>GFP* que se tiñó para GFP, DAPI (como marcador nuclear) y Hth. (A-C) La línea punteada delimita la región del OL. A la izquierda (A) se muestran los canales combinados y a la derecha (B,C) los canales individuales. En (D) se muestra una mayor magnificación de la región encuadrada en C. (A) El GFP permite localizar la presencia de los neuroepitelios del OPC y del IPC y DAPI nos muestra como cada región del OL está delimitada, de manera que se forman agrupaciones celulares. (B) La línea punteada roja marca el Ne del IPC, (B-D) la línea punteada verde marca el Ne del OPC, (B-D) la línea punteada azul marca la zona donde se producen los NB de la médula. (C, D) La expresión de *hth* se detecta en los NB de la médula (ver flecha), así como en neuronas de la corteza de la médula. Mi: médula interna; Mc: corteza de la médula; lc: complejo de la lóbula; L: lámina.

Durante el desarrollo del OL la expresión de *hth* no sólo es detectada en los progenitores Ne del OPC, sino también en los neuroblastos de la médula, en neuronas de la médula, (Reddy et al., 2010; Hasewaga et al., 2011; Morante et al., 2011; Li et al., 2013 Figura 13) y también en la cuesta lateral del surco de la lámina, donde se encuentran las LPCs (Figura 13C; Figura 15A-B). Sin embargo, la expresión de *hth* desaparece en la región más interna de la lámina, en los dominios de pre-ensamblaje y ensamblaje de las neuronas de la lámina.



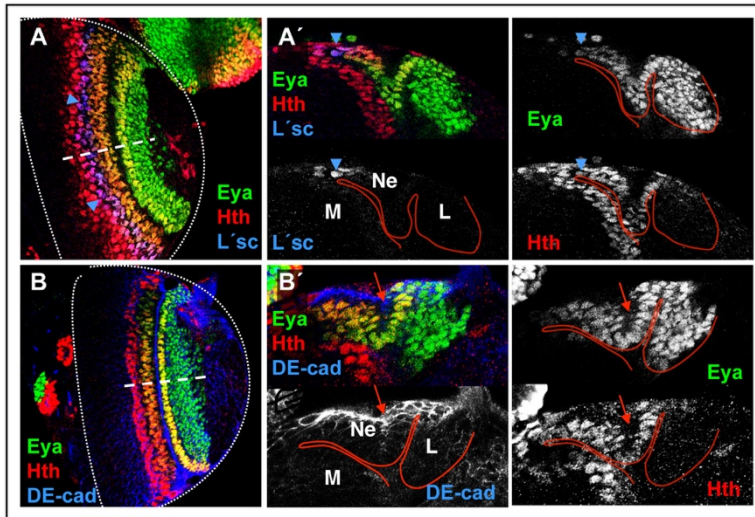
**Figura 14. Progenitores de ojo Hth-positivos también expresan bajos niveles de *eya*.** (A) Vista muy próxima de un disco de ojo en fase tardía L3 teñidos para Hth y Eya. La región se solapamiento de la expresión está flanqueada por dos líneas discontinuas. Se muestran los canales combinados e individuales.

Al igual que ocurre durante el desarrollo del **ED**, los patrones de expresión de *eya/so* y *hth* son complementarios en el OL (Figura 15), siendo la expresión de *eya* más fuerte justo en la región de la lámina donde *hth* desaparece y comienza la diferenciación de la misma (Figura 15 A' y B'). El límite medial de la expresión de *eya* viene marcado por la expresión del gen proneural *L'sc* que se expresa al frente de la ola de diferenciación de los NBs de la médula (Yasugi et al., 2008) (flecha azul en Figura 15A).

### 3. *eya/so* son requeridos para la expresión de *dac*.

Se sabe que la expresión de *dac* está aguas abajo de *eya* y *so* durante el desarrollo del ojo compuesto (Chen et al., 1997) y dado que los patrones de expresión observados para *eya/so* preceden el comienzo de expresión de *dac*, (Figura 12) comprobamos si en el caso de la lámina *eya/so* también regulan la expresión de *dac*. Para ello se indujeron de nuevo clones en los cuales eliminamos la función de *eya*, (induciendo clones del mutante nulo *eya<sup>E8</sup>*) y haciendo *knockdown* en el caso de *so* (*ARNi-so*). En ambos experimentos, la expresión de *dac* no pudo ser activada dentro de los clones y el efecto fue autónomo-celular (Figura 16 A y B). Curiosamente, la pérdida de *eya* o *so* resultó en una desrepresión de *hth*, cabiendo la posibilidad de que la pérdida de *dac* fuera debida a su represión por parte de *hth*.



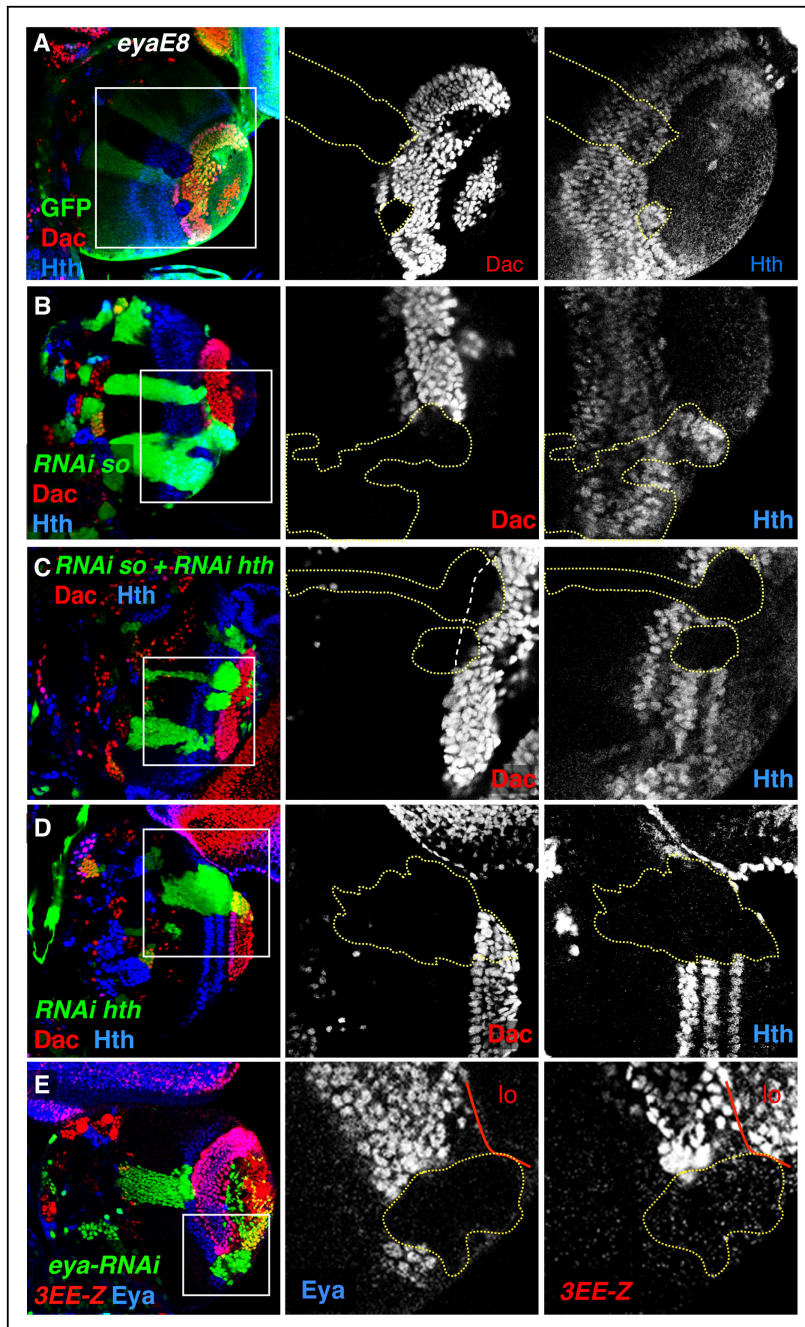


**Figura 15. Expresión de *eya* y *hth* en el OL durante la progresión desde los progenitores del Ne hasta las neuronas de la lámina.** Los OLs están orientados con la región medial hacia la izquierda y la región lateral hacia la derecha. En A y B el OL está marcado por una línea punteada. (A,B) Vistas de la superficie y (A' y B') son secciones-z confocales de globos ópticos L3. Las tinciones son como se indican en los paneles de la figura. Se muestran los canales combinados (paneles izda. y central), así como los canales individuales (paneles dcha.). En A y A' las cabezas de flecha en azul indican las células que expresan *L'sc*. La flecha roja indica la localización del surco de la lámina (LF).

Para distinguir entre un efecto activador directo por parte de *eya/so* y una represión mediada por *hth*, comparamos los efectos producidos sobre *dac* al quitar únicamente *so* con el el resultado de quitar a la vez *so* y *hth*. La expresión de *dac* desapareció de una forma autónoma-celular tanto en clones *so-ARNi* (en los cuales *hth* es mantenido) como en los clones *so-ARNi+hth-ARNi* (Figura 16C). Por lo tanto, la regulación de *dac* requiere la expresión de los genes RD y no parece estar negativamente regulada por *hth* (ver abajo). Además, para descartar *hth* como regulador negativo de una forma más específica, se indujeron clones *hth-ARNi* para observar posibles cambios en los niveles de *Dac*. Se comparó la señal inmunofluorescente de *Dac* dentro y fuera de los clones *hth-ARNi* (Figura 16D, ver M&M) y no encontramos ninguna diferencia significativa (10 clones de 7 globos ópticos fueron analizados). Por lo tanto, *hth* no actúa como represor de *dac* una vez su expresión comienza detrás del LF. Además, el hecho de que la expresión de *dac* no se extendiera medialmente en el dominio de expresión *eya/so* en los clones *hth*<sup>-</sup> indicó que esos genes RD no son suficientes para inducir la expresión de *dac*. Esto concuerda con el hecho de que la vía Hh sea adicionalmente requerida para la expresión de *dac* (Huang and Kunes, 1996).

Un trabajo anterior realizado por Pappu y colaboradores identificaron dos *enhancers* en el gen *dac* con expresión en el ED (Pappu et al., 2005). Uno de ellos, *dac3EE*, dirige además una fuerte expresión del gen reportero en la lámina. A la hora de realizar este trabajo, la estirpe *dac3EE* se había perdido, con lo que la generamos de nuevo utilizando el mismo fragmento del trabajo

original (Pappu et al., 2005; ver M&M). Confirmamos una fuerte expresión de este enhancer en la lámina, además de detectar una débil expresión en la lóbula (Figura 16E). Clones knockdown de *eya*, en los cuales la expresión de *dac* se pierde, también pierden la actividad del enhancer *dac3EE* (Figura 16E). Esto sugiere que *eya* (probablemente junto con *So*) actúa a través del enhancer *dac3EE* para regular la expresión de *dac* en la lámina.



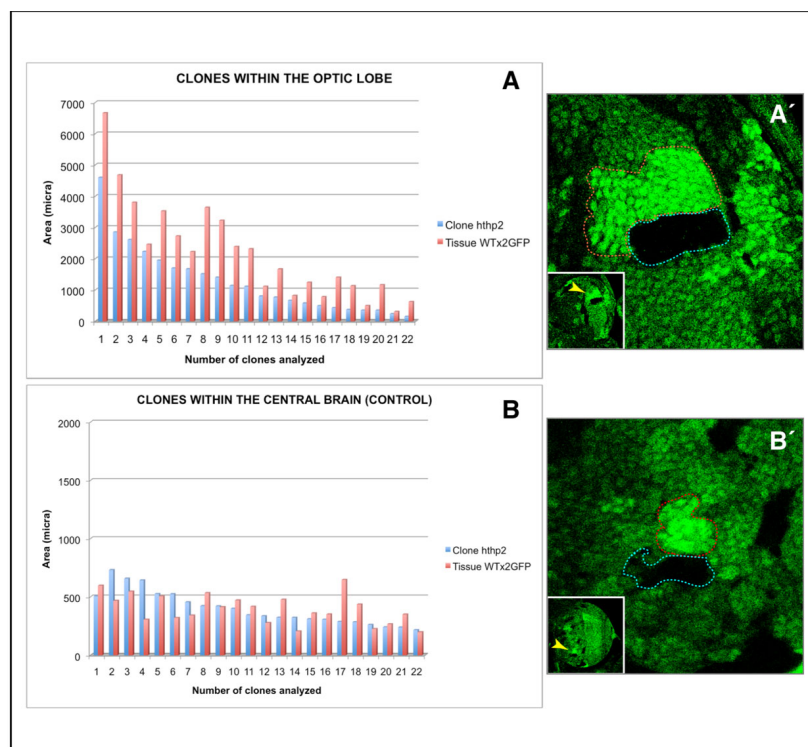
**Figura 16. *eya/so* regulan la expresión de *dac* en la lámina, probablemente a través de la región enhancer *dac3EE*.** (A-E)

Paneles de la izquierda: vista de la superficie de OLS de L3 tardía conteniendo clones. Una mayor magnificación de las regiones encuadradas se muestran en los paneles centrales y los de la derecha, como canales individuales. Los clones están marcados con una línea punteada amarilla. (A, N=1) Las células mutantes de *Eya* no consiguen activar *Dac* y mantienen la expresión de *Hth*. Las células mutantes de *EyaE8* están marcadas por la ausencia de GFP, teñidas para *Eya* y *Hth*. (B, C) *So* es requerido para la expresión de *Dac*. (B, N=3) las células *RNAi-so*, y (C) los clones *RNAi-so + RNAi-hth* están teñidos para *Hth* y *Dac*. Los clones están marcados positivamente con GFP. (B) En las células mutantes para *so* la expresión de *Hth* es mantenida. (C) El fallo para activar la expresión de *Dac* en las células mutantes para *so*, no es debido al mantenimiento de *Hth*. (D, N=6) La expresión de *Dac* no se ve afectada en clones *RNAi-hth*. (E, N=3) Clon *RNAi-eya* marcado con GFP en un fondo *dac-3EE-Z*, teñido con anti-βgalactosidasa (*3EE-lacZ*) y para *Eya*. Dentro del clon, la expresión del enhancer se pierde. En (E) la línea sólida roja separa la lámina de la futura lóbula (lo), donde *dac3EE-Z* también es expresado.

#### 4. *hth* es requerido en el neuroepitelio para promover el crecimiento y para modular la extensión y niveles de expresión de *eya*.

*hth* se expresa en estadios tempranos en los progenitores del neuroepitelio, donde solapa con *eya* y *so* (ver Figura 12), pero no sabemos si *hth* ejerce alguna función en el neuroepitelio. Para averiguarlo, primero analizamos el impacto de la pérdida de *hth* en el crecimiento del tejido. Los clones mutantes *hth* se pudieron recuperar en el OL, aunque resultaron ser un 30-40% más pequeños que sus clones silvestres gemelos (Figura 17), sugiriendo un papel de *hth* en la proliferación. Posteriormente, nos preguntamos si la expresión de *eya* podría verse afectada al quitar *hth*. Debido al pequeño tamaño de los clones *hth*<sup>-</sup>, se indujeron clones de pérdida de función de *hth* usando la técnica *Minute* (ver M&M) con el objetivo de recuperar clones de mayor tamaño y hacer más fácil el análisis de los efectos de retirar *hth* en la expresión de *eya*. Clones *hth*-M+ mostraron una ligera expansión de la expresión de *eya* hacia el lado medial (Figura 18A).

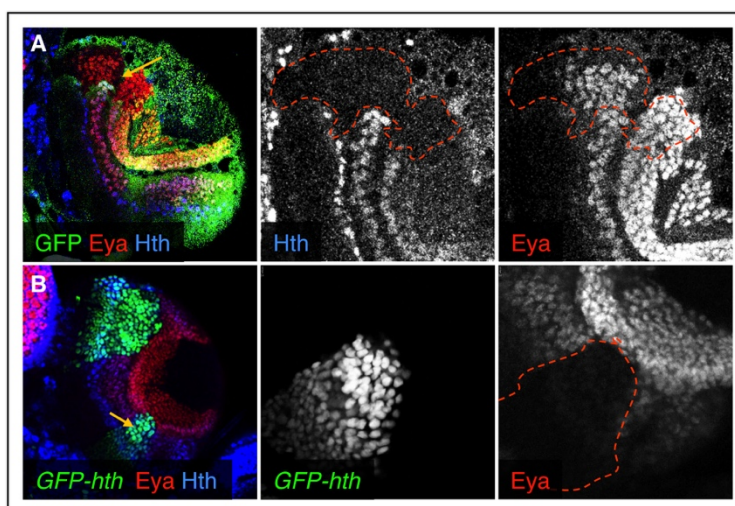
Además, cuando analizamos los niveles de expresión de *eya* comparando la región mutante *hth*<sup>-</sup> con el tejido control adyacente, observamos un incremento de alrededor de un 20% en los niveles de *Eya* en las células *hth*<sup>-</sup> (12 clones *hth*<sup>-</sup>





**Figura 17. La pérdida de *hth* reduce el crecimiento en el neuroepitelio del OL.** (A, B) El gráfico muestra el área del clon, en  $\mu\text{m}$ , de cada par de clones gemelos *hthp2* (barra azul) y silvestre (barra roja), en el centro proliferativo exterior (OPC) de el OL (A) y en el adyacente cerebro central (CB) (B). En el eje X todos los pares de clones mutantes/clones gemelos están representados (N=22 en ambos, el OPC y el CB). El CB se utiliza aquí como un control interno puesto que la expresión de *hth* no está generalizada aquí. En el OPC, el área del clon mutante es siempre menor que el área gemela adyacente en un promedio de un 30-40%, mientras que no hay diferencias en el CB. En A' y B', se muestran dos parejas de clones mutante/gemelo de *hthp2*, una en cada región. Los globos ópticos en fase L3 tardía fueron teñidos para GFP, la línea punteada azul delimita la región mutante del clon y la línea discontinua roja delimita la región silvestre gemela del clon 2xGFP. Para la orientación, las flechas en las inserciones marcan la posición de la pareja de clones. Mientras que en el CB el área del clon *hthp2* (marcada por la ausencia de GFP) es similar a la de su clon gemelo (2xGFP; área con GFP más brillante), en el OPC el clon *hthp2* es más pequeño.

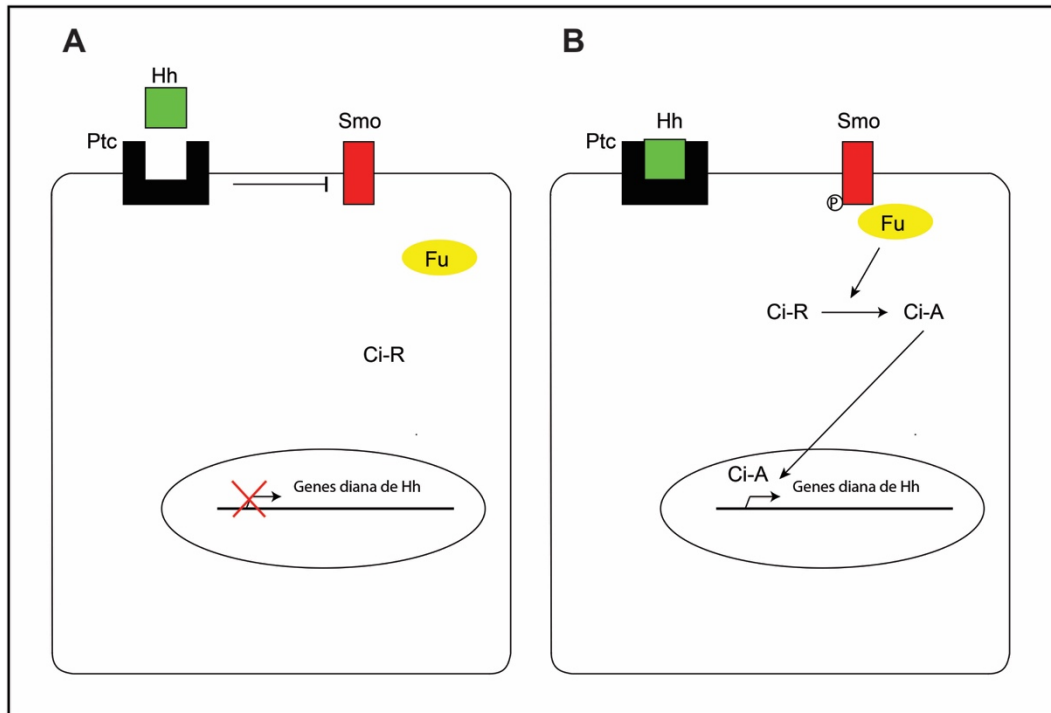
RNAi de siete globos ópticos analizados). Estos resultados indican que *hth* modula la extensión, así como los niveles de expresión de *eya*, sugiriendo que los niveles de *hth* por si mismos podrían estar sujetos a una fina regulación. De hecho, este parece ser el caso, ya que clones sobreexpresando *hth* bloquean la expresión de *eya* en el neuroepitelio (Figura 18B). Sin embargo, hay que resaltar que esta represión fue sólo detectable en el Ne. Ni en clones *smo*- ni tampoco en clones *dac*- (ver apartado 5.1, vía Hh) donde *hth* se expande dentro de la región de la lámina, observamos ningún cambio significativo en la expresión de *eya* posterior al LF. Esto podría indicar que otro factor, aún no identificado, ayuda a *hth* para modular la expresión de *eya* en el Ne. Otra alternativa, podría ser que *dac*, cuya expresión se activa justo después del LF, podría aumentar la expresión de *eya*, siendo ya sus niveles insensibles a Hth.



**Figura 18. *hth* modula la extensión y los niveles de expresión de *eya*.** (A, B) Vista de la superficie de globos ópticos en fase L3 tardía. Las flechas señalan los clones que son mostrados a una mayor magnificación en los paneles centrales y de la derecha, como canales individuales. Los clones están marcados con una línea discontinua roja. (C) Clon *hthp2*, M+, marcado por la ausencia de GFP (en verde), teñido para Hth y Eya. Dentro del clon, la inmunoreactividad de Hth se pierde y la expresión de Eya se extiende medialmente. (D, N=5) Clones Flip-out *GFP-hth* teñidos para Hth y Eya. La expresión forzada de *hth* resulta en la represión de Eya.

## 5. Relación de los genes *hth*/*eya*/*so*/*dac* con la vía Hh.

La vía de señalización de *hh* juega un papel muy importante durante el desarrollo del ojo compuesto, La expresión de Hh en el margen posterior del **ED** dispara el comienzo de la diferenciación y es esencial tanto para el inicio, como para el movimiento de la ola de diferenciación o surco morfogenético (morphogenetic furrow o "MF"; (M. Dominguez and E. Hafen, 1997).

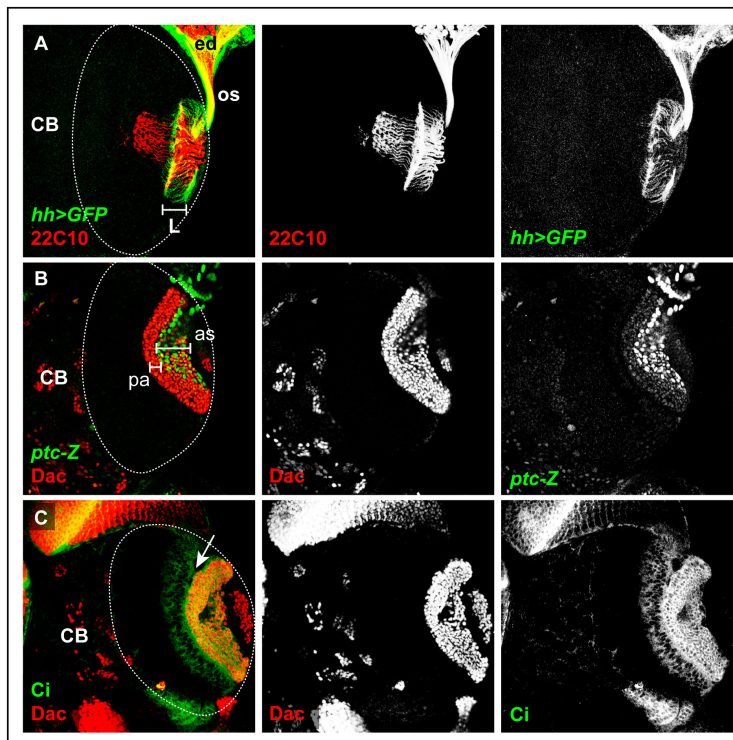


**Figura 19. Vía de señalización de Hh.** (A) En ausencia de Hh, Ptc inhibe Smo, evitando la activación del factor de transcripción Ci, que es mantenido en su forma represora (Ci-R). (B) Cuando Hh se une a su receptor Ptc, éste deja de inhibir a Smo que es fosforilado y se une al complejo que contiene la serina/treonina quinasa Fu que activa Ci, pasando de su forma represora a su forma activa (Ci-A). Ci-A viaja al núcleo donde activa la transcripción de los genes diana de Hh.

La vía de señalización de Hh comienza en la membrana cuando Hh se une a la proteína receptora Patched (*ptc*) (Inham y McMahon, 2001). Con esta unión Ptc es internalizado para su degradación en los lisosomas (Gallet y Therond, 2005). Al retirar Ptc de la membrana plasmática (MP), la transcripción de *smoothed* (*smo*) se activa aumentando sus niveles de expresión y además sufre fosforilación (dependiente de dosis de Hh, Fan et al., 2012), la cuál le protege de la proteólisis, quedando Smo libre para ser localizado en la membrana y ejercer su función. Una vez en la MP, Smo interacciona con el complejo proteico que contiene la Serina/Treonina quinasa Fused (Fu) y esta quinasa activa, mediante

varios procesos de fosforilación, *cubitus interruptus* (Ci) pasando de su forma represora (Ci-R) a su forma activa (Ci-A) (Robbins et al., 1997; Wang et al., 2000; Zhang et al., 2004). En ausencia de Hh, Ptc inhibe Smo, lo que culmina con la transformación de Ci en su forma represora (Ci-R).

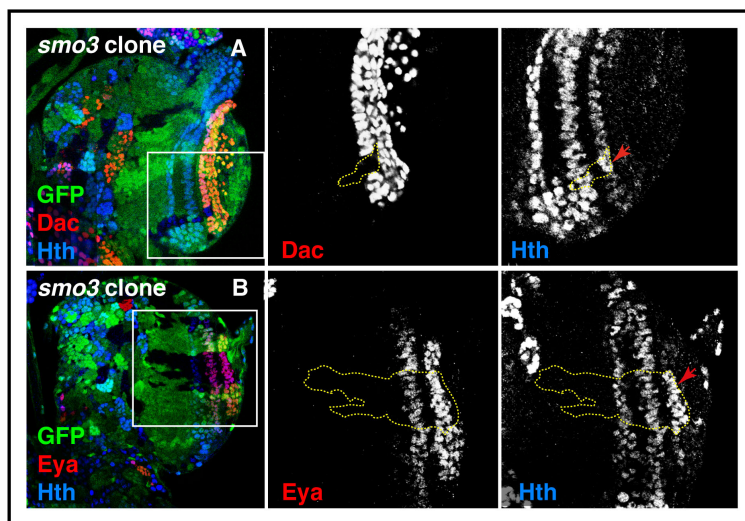
Al activarse Smo se activa una cascada de señalización que induce la expresión del gen *ptc*, entre otros, y activa la proteína codificada por el factor de transcripción *cubitus interruptus* (Ci) (Motzny and Holmgren, 1995; Alexandre et al., 1996; Méthot et al., 2001). En el caso del OL se sabe que la vía Hh es necesaria para la activación tanto de *dac* (Huang and Kunes, 1996) como de *single minded* (*sim*), ambos genes implicados en el proceso de diferenciación de la lámina (Umetsu et al., 2006). Dado que los genes *eya/so* también son requeridos adicionalmente para la expresión de *dac*, resulta interesante averiguar si existe una posible conexión de los genes *eya/so* con la vía Hh.



**Figura 20. Marcadores de la vía de señalización Hh.** (A-C) Vistas de la superficie del OL en fase tardía L3. La línea punteada delimita la región del OL. Se muestran los canales combinados en los paneles de la izquierda y los canales individuales en los paneles del centro y de la derecha. (A) OL de una larva *hh>GFP* que permite seguir la transcripción de *hh*, se tiñó para GFP y 22c10 para poder ver los axones de los fotorreceptores. Se observa GFP en los axones provenientes del disco de ojo (ed) y que llegan a la lámina (L). (B) OL de una larva *ptc-Z* que permite seguir la transcripción del gen *patch* tiñendo con anti- $\beta$ galactosidasa. *Dac* marca la región de la lámina. *ptc* se expresa más fuertemente en la región de ensamblaje de las neuronas de la lámina (as) que en la región de pre-ensamblaje (pa). (C) OL de una larva teñida para Ci y *Dac*. *ci* se expresa en la región de precursores de la lámina y aún más fuertemente lo hace en la región de la lámina, donde Hh es liberado, lo que lo convierte en un buen marcador de la vía Hh. CB (cerebro central).

En nuestros experimentos, la forma activadora de Ci (*CiA*) ha sido utilizado como marcador de la activación de la vía Hh. En la Figura 20 pueden observarse tanto los patrones de expresión de *Ci* como de *ptc*. En el caso de *ptc*, su

expresión se observa en las células de la glia, de forma más evidente en el dominio de ensamblaje de las neuronas de la lámina (as) (Figura 20B), lo que no lo hace ser el mejor marcador de la vía para el OL. Sin embargo, la expresión de *Ci* analizada con el anticuerpo, que reconoce la forma activa de la proteína (ver M&M), muestra una expresión homogénea en la región de la lámina, así como en el Ne. En el panel A de la Figura 20 podemos ver la expresión de *hh* en los axones provenientes de los PRs que atraviesan el tallo óptico (os) y conectan con las neuronas de la lámina. Y, de acuerdo con el trabajo del laboratorio de Kunes, esos axones transportarían la proteína Hh que, al tocar los LPCs, activarían en ellas la vía (Huang and Kunes, 1996) (visualizado por un incremento en la señal de *CiA*). Justo en esta región es donde se detecta más fuertemente la presencia de *Ci-A*, por lo tanto, *Ci* es un buen marcador de la activación de la vía Hh (Figura 20C).

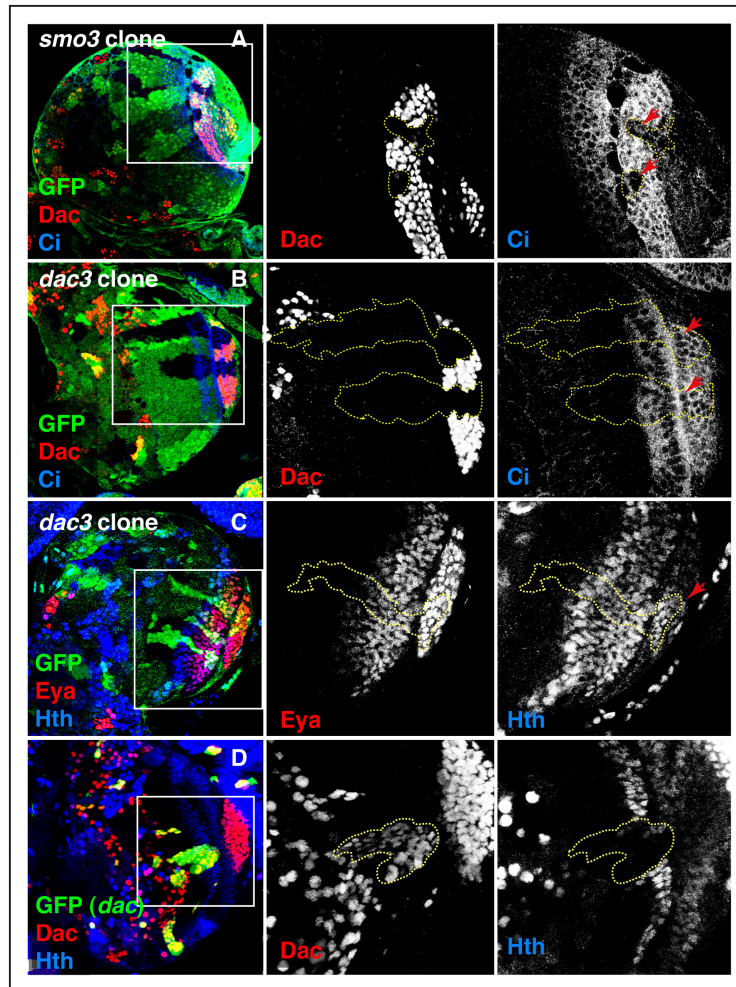


**Figura 21. La vía Hh no afecta ni la expresión ni los niveles de Eya, pero si afecta indirectamente los niveles de Hth .** Los paneles de la izquierda corresponden a vistas de la superficie de OLs en fase tardía L3 conteniendo clones *smo*<sup>3</sup>. Los clones están marcados por la ausencia de GFP. Una mayor magnificación de las regiones encuadradas se observa en los paneles centrales y de la derecha, como canales individuales. (A, N=4) En el clon *smo*<sup>3</sup> *Dac* no se expresa y *Hth* es regulado positivamente y al mismo tiempo su expresión se extiende (B). Los niveles de *Eya* en B (N=7) permanecsn inalterados.

En un primer paso para relacionar los genes *hth/eya/so* con la vía Hh, dado que contribuyen a controlar la expresión de *dac* y por tanto, a la especificación y diferenciación de las neuronas de la lámina, estudiamos el efecto que podría tener la ausencia de la vía Hh sobre estos genes. Para ello indujimos clones FRT *smo*<sup>-</sup> para bloquear la vía Hh, usando como marcador *dac*, cuya expresión sabemos que se pierde en clones *smo*<sup>-</sup> (Figura 21A; Huang and Kunes, 1996) y observamos el efecto sobre *hth*. En clones *smo*<sup>-</sup>, *hth* experimenta un incremento en el nivel de expresión (Figura 21A) y una expansión en la región de la lámina

(Figura 21B). En los mismos clones *smo*- analizamos el efecto sobre *eya* (Figura 21B). En estos clones, aunque de nuevo se observa la expansión de *hth*, el patrón de expresión de *eya* no se ve afectado, ni tampoco sus niveles de expresión, resultando su regulación independiente de la vía Hh. Dado que Hh activa la expresión de *dac* (Huang and Kunes, 1996), cabría la posibilidad de que la desrepresión de *hth* fuera debida a la falta de *dac* y no al efecto directo de Hh sobre *hth*. Para comprobarlo, observamos si el patrón de expresión de *hth* se veía alterado en clones *dac*- y confirmamos que en estos clones también se producía una desrepresión y expansión de *hth* en la región de la lámina (Figura 22C). Para probar que este efecto no fuera debido a un bucle de regulación de *dac* sobre la vía Hh (i.e. que la pérdida de *dac* causase un fallo en la señalización por la vía de Hh), analizamos el requerimiento de *dac* para la actividad de la vía Hh. Si bien en los clones *smo*- la expresión de CiA (Motzny and Holmgren, 1995; Alexandre et al., 1996) está reducida (Figura 22A), en clones *dac*- la expresión de CiA no se vió alterada (Figura 22B), indicando que *dac* no es requerido para la transducción de la señal de *hh*. El conjunto de estos resultados indica que *dac* es requerido aguas abajo de *eya/so* y de la vía *hh* para reprimir *hth*. De hecho, cuando expresamos *dac* ectópicamente en clones en el Ne, el resultado fue una regulación negativa autónoma celular de *hth* (Figura 22D), indicando que *dac* no sólo es requerido, sino suficiente para reprimir *hth* ectópicamente en clones en el Ne, el resultado fue una regulación negativa autónoma celular de *hth* (Figura 22D), indicando que *dac* no sólo es requerido, sino suficiente para reprimir *hth*.

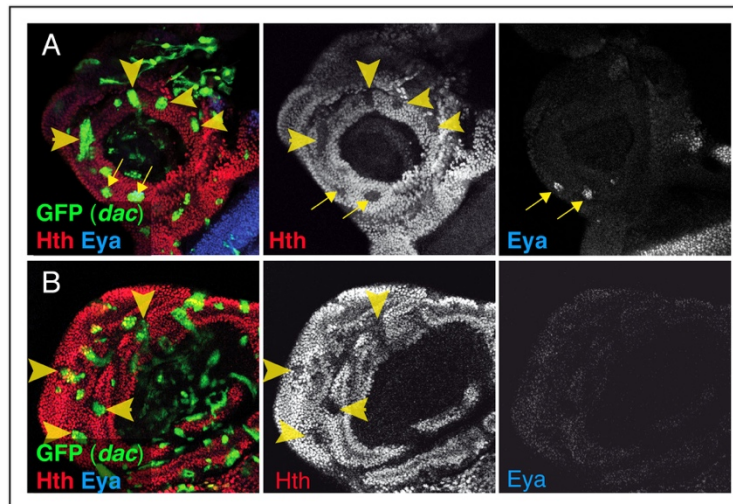




**Figura 22. *dac* reprime *hth* aguas abajo de la vía Hh.** Los paneles de la izquierda corresponden a vistas de la superficie de OLs en fase tardía L3 conteniendo clones (A) *smo3*, y (B,C) *dac3*, marcados por la ausencia de GFP, y (D) expresión ectópica de *dac* marcados positivamente por GFP. Una mayor magnificación de las regiones encuadradas se observa en los paneles centrales y de la derecha, como canales individuales. Los clones *smo3* y *dac3* fueron teñidos para Dac y Ci (A,B), Eya y Hth (C) y Dac y Hth (D). (A, N=2) En el OL, la expresión de *ci* depende de la señal *hh*, de este modo la señal de *ci* se ve reducida en los clones *smo3*. (B, N=2) Este no es el caso de los clones *dac3*, lo que sugiere que en ausencia de *dac*, la señalización de *hh* sigue activa. (C, N=2) La pérdida de *dac* resulta en una extensión del dominio de Hth hacia la lámina. (D, N=2) Clon Flip-out expresando *dac* y marcado con GFP y teñido para Dac y Hth. En clones de ganancia de función de *dac*, *hth* es reprimido.

Molecularmente, se ha demostrado que la proteína Dac trabaja, al menos en algunos contextos del desarrollo, en un complejo con las proteínas So/Six y Eya (Chen et al., 1997; Pignoni et al. 1997; Ikeda et al., 2002). Con el objetivo de obtener más información sobre si dicho complejo podría estar implicado en la represión de *hth* en la región de la lámina en desarrollo, examinamos el potencial represivo de *dac* sobre la expresión de *hth* en células privadas de *eya*. Puesto que *eya* se expresa ya en el Ne, clones de expresión de *dac* fueron

examinados en discos imaginales de antena y de ala, donde *eya* no se expresa. Los clones *dac*<sup>+</sup> indujeron *eya* sólo en la región ventral de la antena (Figura 23A). Ya sea en la retina, la pata o el ala, los clones *dac*<sup>+</sup> no activaron *eya* y aún así fueron capaces de reprimir *hth* de una manera autónoma celular (Figura 23), indicando que *Dac* tiene el potencial, por si solo, para actuar como represor sin la obligada necesidad de la participación de *Eya*/*So*, al menos en el tejido imaginal.

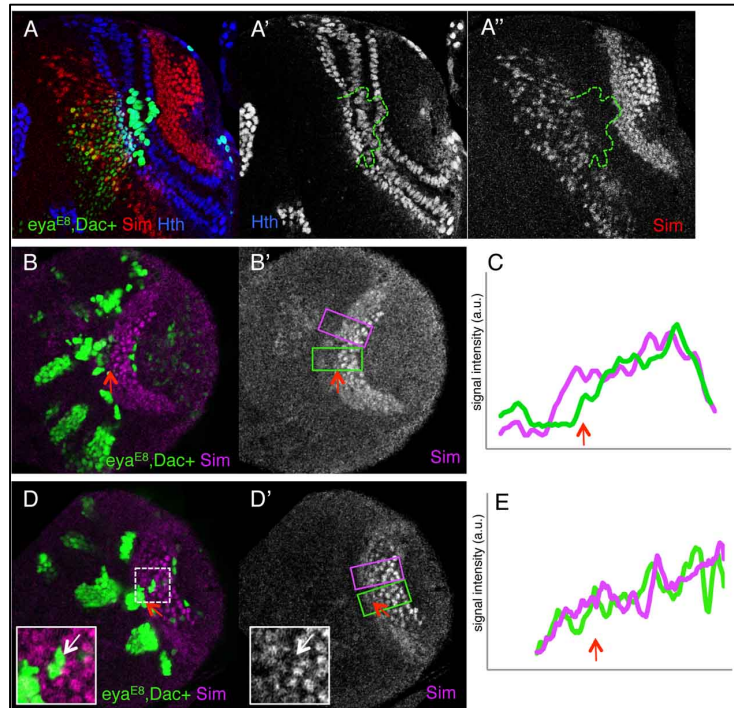


**Figura 23. *Dac* puede reprimir *hth* en discos imaginales independientemente de la presencia de *Eya*.** (A, B) clones de expresión de *dac*, marcados positivamente con GFP y teñidos para *eya* y *hth*. En los discos de antena (A), sólo los clones ventrales *Dac*<sup>+</sup> activan *Eya* (flechas). En cualquier otro lugar los clones *Dac*<sup>+</sup> reprimen *Hth* de una forma autónoma celular sin la expresión detectable de *Eya* (puntas de flecha). De forma similar, en discos de ala (B), los clones *Dac*<sup>+</sup> reprimen *Hth* de forma autónoma celular sin que se detecte la expresión de *Eya* (puntas de flecha; B). Se muestran tanto los canales combinados (a la izda) como los canales individuales (central y dcha).

Sin embargo, posteriores análisis en los OLs mostraron que, cuando se realizaron clones expresando *dac* y que al mismo tiempo carecen de *eya* (y por tanto de *so*) usando la técnica MARCM, los niveles de *Hth* en estos clones fueron similares a aquellos en la región adyacente de células normales (N=5) (Figura 24). Estos clones *eya*<sup>-</sup> *dac*<sup>+</sup>, al igual que los clones sólo mutantes para *eya* lindan con la lámina, pero rara vez son capaces de expandirse dentro de ella. Sólo en dos casos (de más de 40 clones examinados) los clones *eya*<sup>-</sup> *dac*<sup>+</sup> se expanden claramente en el dominio de pre-ensamblaje de la lámina, permitiendo el análisis de los clones en la región de expresión de *Sim*.

*Single-minded (sim)* es un factor de transcripción bHLH-PAS implicado en el ensamblaje de las neuronas de la lámina en los respectivos cartuchos que formarán el mapa retinotópico. *sim* es también uno de los genes activados por *Hh* (Umetsu et al., 2006). Como se describe en el siguiente apartado, *sim* es reprimido por *Hth*, cuando éste es expresado ectópicamente o desreprimido dentro de la región de la lámina. En otros clones *eya*<sup>E8</sup> *Dac*<sup>+</sup> se utilizó *Sim* como marcador de la posible represión de *hth* por parte de *Dac*. Así, si *Dac* no fuera

capaz de reprimir por sí sólo *hth* en ausencia de Eya, esperaríamos que los niveles de Sim fueran más bajos, pues en clones *eya*<sup>-</sup>, Hth se desreprime, pudiendo reprimir *sim* (ver apartado 6).



**Figura 24. Dac requiere de la presencia de Eya para reprimir *hth* en el neuroepitelio del OL.** Clones MARCM *eyaE8, dac+*, marcados positivamente con GFP y teñidos para Hth y Sim (A-A') o sólo para Sim (B, D). (A) Un clon *eyaE8, dac+* marcado con GFP que se extiende sobre el dominio de *hth*, y es colindante con la región de la lámina, no muestra cambios significativos en la señal de Hth. El contorno del clon está marcado por la línea discontinua verde. (B) Un globo óptico que contiene muchos clones GFP. La flecha señala un clon que parcialmente solapa con las células que expresan Sim. En estas células (en el recuadro verde) la señal de Sim está reducida comparada con las células silvestres vecinas (recuadro en magenta). En (C) el perfil de la señal de Sim de ambos recuadros están representados en el gráfico. La señal de Sim es más débil en la región afectada por el clon. La medida aproximada del clon está marcada por la flecha. Un clon similar (D, flecha) no muestra diferencias en los niveles de expresión de Sim (ver la comparación de los perfiles de la señal de Sim desde la región afectada (recuadro verde) y la región vecina silvestre (recuadro magenta) en E, donde la flecha roja marca la medida aproximada del clon. El mismo globo óptico, un pequeño clon de *eyaE8, dac+* (en los recuadros D y D' se ve la ampliación de la región punteada) muestra los niveles de fondo de la señal de Sim. Se muestran tanto los canales individuales como combinados.

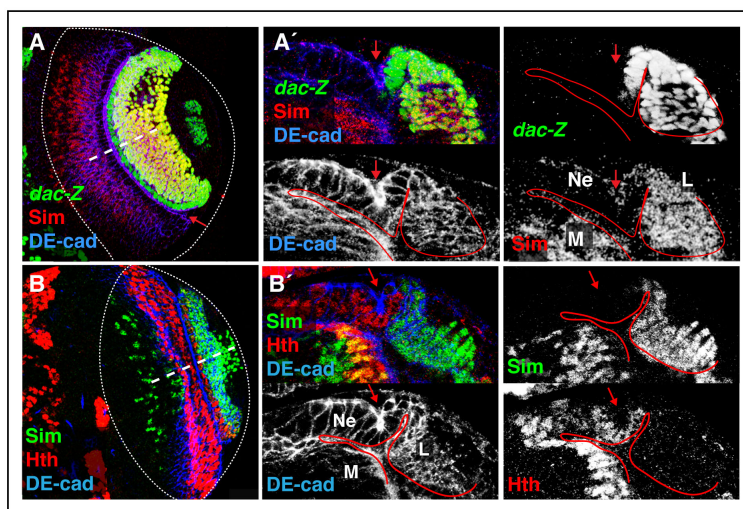
En uno de los casos, la expresión de Sim se redujo dentro del clon (Figura 25B' y Figura 25C), mientras que en el otro clon no se observó ninguna alteración notable en los niveles de Sim. En el primer lo interpretamos como que la expresión de *hth* no fue reducida por la expresión únicamente de *dac* y, al seguir presente, reprime a Sim. Los clones *eya*<sup>-</sup> *dac*<sup>+</sup> no consiguen entrar en la lámina y fueron muy infrecuentes y pequeños. Estos resultados sugieren que Dac no es capaz de regular *hth* en la ausencia de su compañero Eya. Con esta limitada evidencia podemos sugerir que Dac requiere Eya para reprimir eficientemente *hth* y permitir así la expresión de *sim* en la lámina. La baja tasa



de recuperación de clones *eya-dac+* en los OLs puede ser debido a altas tasas de apoptosis inducidas por la sobre-expresión de *dac*, que detectamos utilizando un anticuerpo contra Caspasa 3 activada en OLs de los cerebros con expresión ectópica de *dac+* (datos no mostrados).

## 6. La represión de *hth* en las células de la lámina es necesaria para la regulación positiva de *sim*.

Como ya hemos comentado anteriormente, además de inducir la expresión de *dac* en las células de la lámina (Huang and Kunes, 1996), *Hh* también induce la expresión de *single-minded (sim)* (Umetsu et al., 2006). Mutantes para este gen presentan deficiencias en el ensamblaje de las neuronas, quedando éstas acumuladas en el dominio de pre-ensamblaje (Umetsu et al., 2006). Siendo *sim* un factor esencial durante el desarrollo de la lámina, estudiamos en detalle su patrón de expresión, el cual abarca la región de la lámina, de una manera difusa en la región de pre-ensamblaje y volviéndose más evidente y nuclear en las neuronas en la región ensamblada (Figura 25). Si bien la región de expresión de *sim* es bastante similar al dominio de expresión de *dac*, éste último se detecta claramente en la cuesta descendente del LF (Figura 25A), coincidiendo con *hth*, mientras que *sim* se expresa posterior a la cuesta descendente del LF, mostrando por tanto un patrón de expresión excluyente con respecto a *hth* (Figura 25B).



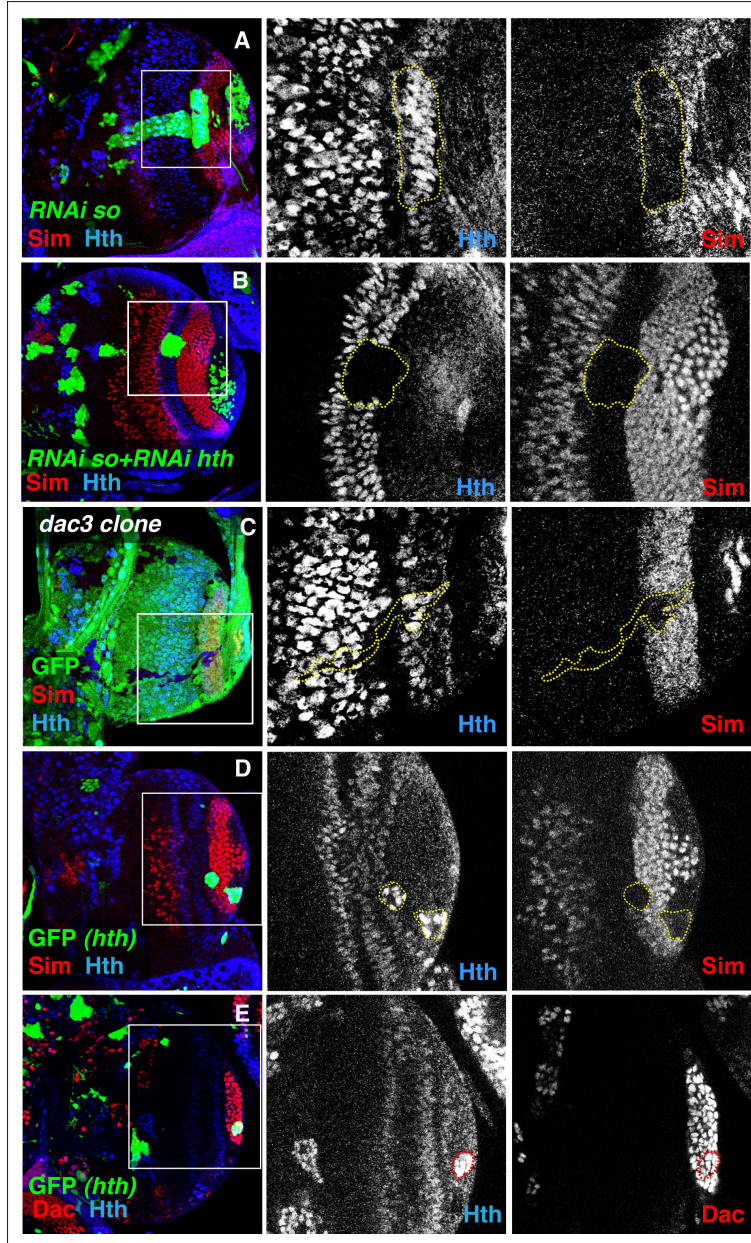
**Figura 25. Expresión de Dac y Sim en el OL durante el progreso desde progenitores del Ne hasta neuronas de la lámina.** los OLs están orientados con su lado medial hacia la izda. y su lado lateral hacia la dcha. En A y B, el OL está marcado con una línea punteada. La línea discontinua más gruesa indica aproximadamente la posición de las secciones que se muestran en los paneles de la derecha. A y B son imágenes de la superficie del OL, mientras que A' y B' son secciones-z confocales de globos opticos en fase tardía L3. Se muestran los canales combinados, así como los canales individuales de las secciones-z. La flecha roja indica la localización del surco de la lámina (LF). En (A), el globo óptico es de una larva *dac-Z*. La tinción con  $\beta$ -galactosidasa se usa para seguir la

transcripción de *dac*. En A' se observa como *dac* se expresa en la cuesta descendente del LF; mientras que *Sim* está restringido a la región de la lámina. En B' se observa la complementariedad excluyente entre los patrones de *Hth* y *Sim*. Se utilizó DE-cad para teñir el neuroepitelio y facilitar la localización de la LF.

Para estudiar la relación entre el cassette *hth/eya/so/dac* y el factor de transcripción dependiente de Hh, *sim*, responsable de la posterior diferenciación de las neuronas de la lámina (Umetsu et al., 2006), realizamos experimentos de inducción de varios tipos de clones. En clones knockdown de *so* (*ARNi-so*) observamos la ausencia de *Sim*. Sin embargo, en estos clones sabemos que *hth* es dereprimido (Figura 26A). Por tanto, cabe la posibilidad de que la ausencia de *Sim* responda a una represión por parte de *hth* al dereprimirse éste en esa región.

Para discernir entre ambas posibilidades, es decir, el requerimiento de un input positivo por parte de los genes RD o bien la existencia de un represor (*hth*), se eliminó o atenuó la expresión de *so* y *hth* simultáneamente. En estos clones *so-*, *hth-* la expresión de *sim* también desaparecía (Figura 26B), indicando pues la necesidad de un input positivo por parte de los genes RD para activar la expresión de *sim*. Otro aspecto a tener en cuenta es el requerimiento de estos genes RD, *eya* y *so* para la expresión de *dac*, apareciendo una nueva incógnita que desvelar: ¿son *eya* y *so* directamente requeridos para la expresión de *sim*, o se trata de un efecto indirecto por la ausencia de *dac*? Para ello observamos clones *dac-* (*dac*<sup>3</sup>), en los cuales sabemos que la expresión de sus reguladores *eya/so* no se ve comprometida. El resultado fue nuevamente la pérdida autónoma celular de la expresión de *sim* en estos clones *dac-* (Figura 26C). De nuevo el bucle de regulación nos planteó una nueva incógnita: Sabemos que en clones *dac-*, la pérdida de *dac* viene acompañada por una derepresión de *hth* (Figura 21, Figura 22C, Figura 26A y C), de forma que aunque se requiera un input positivo de los genes *eya/so/dac*, esto no descarta que *hth* también pueda aportar un componente de regulación negativa. Para determinar si *hth* era directamente el responsable de la represión de *sim* en las células *dac-*, indujimos clones de expresión ectópica de *hth* en la lámina (Figura 26D y E). En estos clones observamos que no sólo *sim* es reprimido (Figura 26D), sino que esta represión ocurre sin cambios detectables sobre la expresión de *dac* (Figura 26E). Por tanto, podemos concluir que los genes RD son requeridos para la expresión de *sim* actuando tanto como activadores de *sim*, como represores de *hth*. Un

papel crítico en esta regulación es llevado a cabo por *dac*, el cual es necesario para reprimir *hth*.



**Figura 26. La expresión de *sim* depende de una regulación directa por parte de los genes RD y de la represión por parte de *Hth*.** (A-E) Vistas de la superficie de OLs en fase tardía L3. Imágenes a mayor magnificación de las regiones encuadradas se muestran en los paneles centrales y de la derecha, como canales individuales. (A, B) La expresión de *Sim* depende de una "señal" por parte de los genes RD. Los clones RNAi-so (A) y RNAi-so+RNAi-hth (B, N=4), marcados positivamente por la expresión de GFP fueron teñidos para *Hth* y *Sim*. En ambas situaciones, la expresión de *Sim* se perdió de forma autónoma celular. (C, N=8) En clones *dac3* (marcados por la ausencia de GFP), *Hth* es mantenido, mientras que la expresión de *Sim* se pierde. (D, E) Expresión ectópica de *hth* en clones dentro de la lámina. Los clones están marcados positivamente por GFP y fueron teñidos para *Hth* y *Sim* (D, N=11) y *Hth* y *Dac* (E, N=5). La expresión de *Sim* se pierde de forma autónoma celular mientras que la expresión de *Dac* permanece inalterada.

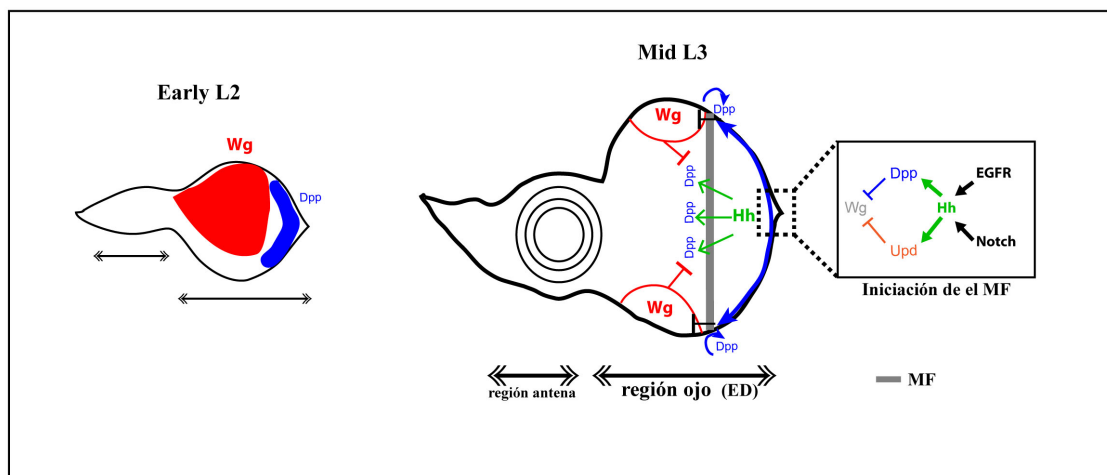
## 7. Relación de los genes *hth/eya/so/dac* con las vías de señalización Dpp (BMP4) y Wingless (Wnt).

### 7.1 Dpp y Wg durante el desarrollo del disco imaginal de ojo.

*decapentaplegic* (*dpp*) codifica para una molécula tipo BMP2/4, un miembro de la superfamilia TGF $\beta$ , la cual está ampliamente conservada entre especies y juega papeles clave en diversos procesos celulares y moleculares (reviewed by Hogan, 1996; Massague and Chen, 2000). En *Drosophila*, DPP proporciona información posicional actuando como un morfógeno (Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996) (reviewed by Tabata and Takei, 2004), y controla la proliferación y el modelado en diversos tejidos, incluyendo el disco imaginal de ojo, entre otros. En este tejido, la expresión de *dpp* está bajo el control de Hedgehog (Hh), que actúa como inductor a corto alcance de *dpp*. Como se ha mencionado previamente en la introducción, durante el segundo estadio larvario, *dpp* se expresa en el margen posterior del disco imaginal de ojo (Blackman et al., 1991) y posteriormente durante el desarrollo contribuye al comienzo de la diferenciación retinal, mediante la iniciación del surco morfogenético (MF) (Figura 27) y la activación de los genes tempranos de retina (*eyes absent*, *sine oculis* y *dachshund*) (Curtiss and Mlodzik, 2000). Después de la iniciación de la diferenciación, la expresión de *dpp* queda restringida a una fila de células dentro del MF. Todos estos procesos de proliferación y modelado del ojo de *Drosophila* son también controlados por la vía de señalización de Wingless (*wg*; Wnt en vertebrados), la cual acota la región del ojo, asegurando una correcta y ordenada morfogénesis de los fotorreceptores, además de definir la identidad de la cápsula cefálica (Treisman and Rubin, 1995; Royet and Finkelstein, 1996). Durante el primer estadio larvario, *wg* se expresa en el dominio anterior del disco imaginal de ojo y al mismo tiempo, *dpp* se expresa en el dominio posterior (Figura 27). Dado que las moléculas codificadas por estos genes son moléculas de secreción que actúan como señales a largo alcance, y considerando que, en este estadio del desarrollo el disco imaginal es pequeño, se supone que todas las células reciben ambas señales. Esta característica y la descripción del antagonismo entre *wg* y *dpp*, explica porqué la especificación del ojo no puede tener lugar durante el primer y segundo estadios, incluso con la presencia de los genes selectores de ojo (*eyeless* y *twin of eyeless*), que ya



están presentes. Sólo cuando el disco alcanza un tamaño considerable y los dominios de expresión de *wg* y *dpp* están suficientemente separados, la expresión de *dpp* en la región más posterior del disco es capaz de activar los genes tempranos de retina gracias a los bajos niveles de Wg, el cual queda restringido a los márgenes anteriores dorsal y ventral del disco (Treisman and Rubin, 1995).



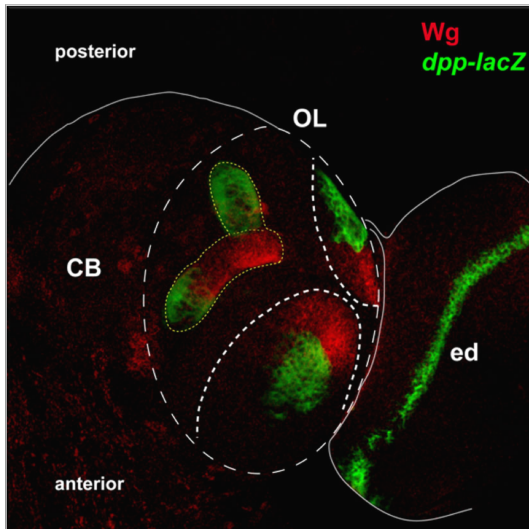
**Figura 27. Contribución de Dpp a la iniciación y progreso del movimiento del surco morfogénico (MF).** La imagen representa a la izquierda un esquema del ed en L2 temprana, donde se muestran los dominios de expresión de *Wg* y *Dpp*, y a la derecha se muestran ambos patrones, pero en un ed en estadio L3. Durante los primeros estadios larvarios hasta comienzos de L3 (imagen izquierda) *wg* se expresa en el dominio anterior del disco imaginario de ojo y al mismo tiempo, *dpp* se expresa en el dominio posterior. En este estadio el primordio de ojo es pequeño, por lo que las células reciben ambas señales *Dpp* y *Wg*, anulándose mutuamente. *Wg* inhibe la diferenciación de la retina, pero llega un momento durante el desarrollo, cuando el disco ha alcanzado un tamaño apropiado (imagen derecha), en el que las vías *EGFR* y *Notch* disparan la expresión de *hh* en el margen posterior, el cual a su vez controla la expresión de *dpp* en la región adyacente. *Dpp* y *Upd* actúan como promotores de la diferenciación del ojo, inhibiendo la señal de *Wg* y permitiendo que el MF progrese. La anchura del MF aumenta conforme éste se desplaza hacia la región anterior, por lo que la diferenciación tiene que ser reiniciada a lo largo de los márgenes laterales (ver flechas azules en los márgenes). Este proceso depende de la señal de *Dpp*. MF: surco morfogénico; Early: temprana; Mid: a mediados de.

## 7.2 Vías de señalización de Wg/Wnt y Dpp/BMP4 durante el desarrollo de los globos ópticos.

La expresión de *wg* es detectada en dos dominios simétricos del OPC que se encuentran en las regiones distales de éste. Dicho de otro modo, en los extremos de la herradura que forman los OLs (Figura 28). Si bien, también encontramos su expresión y la de *dpp* en dos dominios del IPC casi-simétricos (Shoko Yoshida et al., 2005; línea discontinua amarilla en Figura 28), lo cual hace probable que sean requeridos de algún modo para el desarrollo de la lóbula. Se sabe que *Wg* es requerido durante la formación de los OLs para inducir y mantener la expresión del producto de secreción del gen *dpp* en los dominios adyacentes (Kaphingst and Kunes, 1994).



Wingless actúa a través de la vía de *decapentaplegic* (*dpp*) (Spencer et al., 1982; Padgett et al., 1987) para organizar los centros visuales del cerebro de *Drosophila*, o también llamados a lo largo de este capítulo, globos ópticos. Según los estudios de Kaphingst y Kunes, la expresión de Wg es detectada por primera vez alrededor de las 10h del desarrollo larvario (31h AEL) en una única célula en la posición más ventral del OPC. Aproximadamente 6h más tarde, la



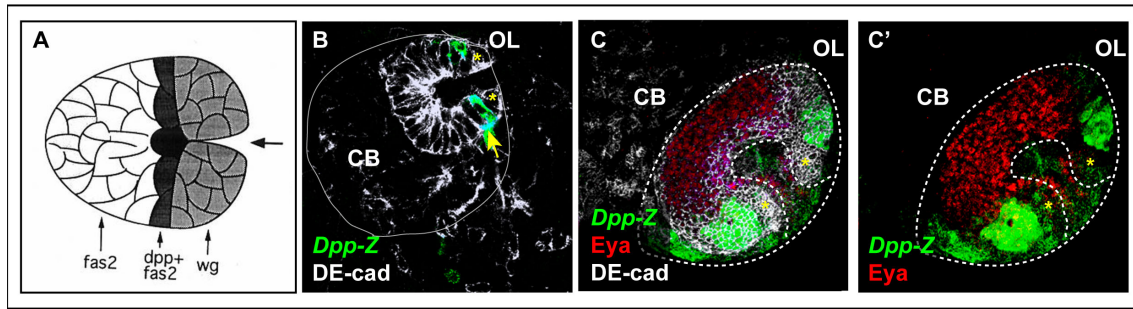
**Figura 28. Wg y Dpp se detectan tanto en el IPC como en el OPC en dominios de expresión adyacentes.** Vista lateral-angular de un OL de una larva tardía L3, que presenta la construcción *dpp-Z*, lo que permite seguir la transcripción de *dpp*. La detección de *dpp* se realiza gracias a una tinción con anti- $\beta$ galactosidasa (verde) y se utilizó anti-Wg para detectar también la presencia de esta molécula de señalización. Para la orientación se indica el lado posterior (arriba) y el lado anterior (abajo, donde se encuentra el cordón nervioso ventral). La región del OL se encuentra delimitada por una línea discontinua blanca. Con una línea discontinua menos marcada se encuentra delimitada la región del OPC y la línea punteada amarilla delimita el IPC. nótese que también aparece la expresión de *dpp* en el ed. La expresión de *wg* (rojo) puede observarse claramente en los extremos de la herradura del OPC, mientras que la expresión de *dpp* (verde), se muestra adyacente y más distante de los extremos de la herradura. OL: globo óptico; CB: cerebro central; ed: disco de ojo.

célula más dorsal del OPC comienza a expresar *wg*. Con la excepción de éstas dos células que expresan *wg*, las demás células del OPC expresan la molécula de adhesión celular fasciclina II (*FasII*), el producto del gen *fasII* (Grenningolh et al., 1991). Aproximadamente 14h más tarde del comienzo de la expresión de *wg*, la expresión de *dpp* es detectada por primera vez en una célula adyacente a las células que expresan *wg*. Hacia el final del segundo estadio larvario, cada uno de los dominios *dpp* contiene entre 6 y 7 células cada uno. Esta expresión de *dpp* coincide exactamente con la reproducida por la construcción de la inserción del reportero *lac-Z* en la región BS 3.0 del promotor del gen *dpp* (Blackman et al., 1991; Figura 29C y C'). Las células que expresan *dpp* también expresan *fasII*, mientras que no se detecta *FasII* en las células que expresan *wg*.

Se sabe que los dominios de expresión de *wg*, *dpp* y *fasII* corresponden a poblaciones celulares que proliferan a lo largo del desarrollo larvario (Kaphingst and Kunes, 1994). De hecho, la pérdida de función tanto de *wg*, como de *dpp*,

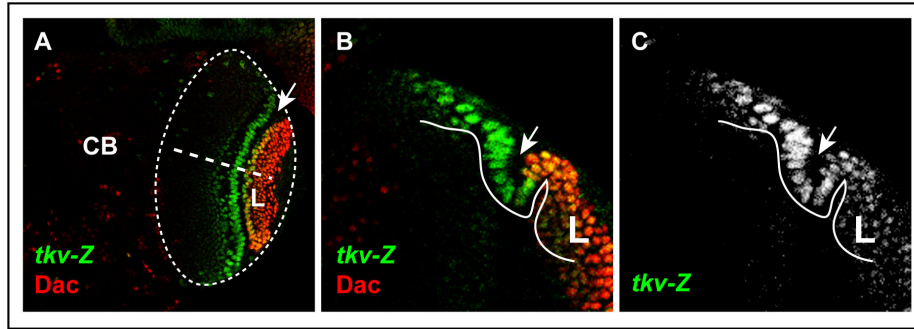
durante el desarrollo larvario produce una disminución de la tasa de proliferación celular en el OPC, lo cual concuerda con el fenotipo observado en larvas de tercer estadio. Estas larvas mutantes, presentan una médula reducida a un remanente como una pequeña región circular, así como también una reducción de la lámina. Pero no sólo se ve afectada la proliferación, sino también el destino celular. Así, si lo normal es que las células que van a formar la corteza medular, cuando comienza el tercer estadio larvario dejen de expresar *fasII* y comiencen a expresar marcadores de diferenciación como *Elav* (Robinson and White, 1988; Bier et al., 1988; Selleck and Steller, 1991), en el caso de cerebros mutantes para *dpp*, Kaphingst y Kunes observaron que el dominio de expresión de *fasII* estaba bien extendido fuera de la lámina hasta incluir grandes áreas de la corteza medular, lo cual indica que el programa de diferenciación neuronal también se ve afectado. Así, la reducción, al menos de la médula, en animales mutantes para *wg* y *dpp* es debida tanto a la incapacidad de producir células precursoras corticales como al fallo de estos precursores en convertirse en las correspondientes células diferenciadas. Se ha observado que los mutantes *dpp* que reproducen el fenotipo de los mutantes *wg*, son justo aquellos que tienen truncada la región reguladora dependiente de *wg*. La similitud de estos fenotipos sugiere que *wg* podría actuar vía *Dpp* para inducir a la progenie del OPC a asumir sus respectivos destinos neuronales (Kaphingst and Kunes, 1994; Spencer et al., 1982; Padgett et al., 1987).

Por otra parte, la expresión simétrica de *Wg* en el OPC es lo que define las regiones dorsal y ventral de la región diana (lámina y corteza de la medula) hacia donde inervan las fibras de la retina en crecimiento. El gen homeobox *Distal-less* (*Dll*) se expresa en las células que expresan *wg* y se encuentran adyacentes al dominio *dpp*, siendo significativamente mayor su expresión en el dominio dorsal. Los patrones de expresión de *wg*, *dpp* y *Dll* revelan distintas identidades de posición para las poblaciones celulares a lo largo del eje dorso-ventral de la región diana de inserción de los axones de los PRs (Kaphingst and Kunes, 1994).



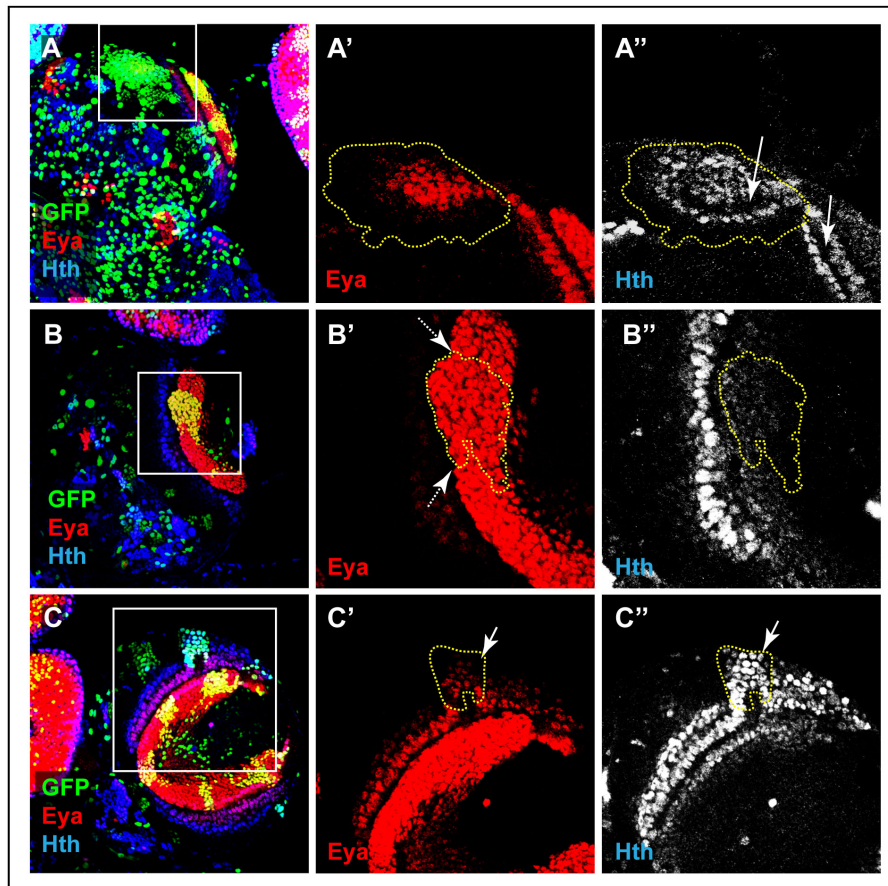
**Figura 29.** Imágenes de la región OPC del globo óptico, la línea punteada delimita la región del OL en C y C', y el asterisco amarillo representa el dominio de expresión de *wg* en B, C y C'. (A) Esquema (Kaphingst and Kunes, 1994) del Neuroepitelio del OPC mostrando los dominios de expresión de los genes *wg*, *dpp* y *fas2*, durante la fase temprana del estadio L2. (B, C, C') Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia. (B) OL en fase temprana L2 teñido con DE-cad (blanco) para mostrar el neuroepitelio y con  $\beta$ -gal (verde) para marcar el dominio de expresión de *dpp*. (C, C') OL en fase tardía L2, DE-cad (blanco) marcando el neuroepitelio,  $\beta$ -gal (verde) marcando un mayor número de células *dpp*+ y *Eya* (rojo) en las células del neuroepitelio precursoras de la lámina. La expresión de *eya* no fue detectada dentro de los dominios de *dpp*.

Otro papel propuesto para *dpp* es como responsable de controlar el desarrollo de la glía, que sirve de soporte a las neuronas de la lámina. Según el trabajo de Shoko Yoshida y colaboradores, las regiones marginales dorsal y ventral donde se expresa *dpp* son regiones donde se forman los precursores de la glía de la lámina. En sus estudios mostraron que el factor de transcripción *glial cells missing* (*gcm*), expresado en la glía de la lámina desde un estadio temprano de diferenciación y esencial para el correcto desarrollo y diferenciación de la misma (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996), depende de la actividad de *dpp* en los OLs. Es por ello que el número de células *gcm*-positivas, así como el de células maduras de la glía, se ven severamente reducidas en los mutantes *dpp*, así como en clones mutantes de los componentes intracelulares de la vía Dpp y la activación ectópica de la vía Dpp induce la expresión de *gcm* (Yoshida et al., 2005).



**Figura 30** Imágenes de de la expresión del receptor codificado por el gen *tkv* en la región del OL (línea punteada) de una larva *tkv-Z*. (A) Vista ventral superior de un globo óptico donde se muestra la expresión de  $\beta$ -gal (verde) que corresponde al receptor Tkv, así como la expresión del gen *dac* (rojo) que marca las neuronas de la lámina. (B,C) Secciones del OL a mayor magnificación, de la región correspondiente a la línea discontinua de la figura A, mostrando el dominio de expresión de *tkv* con respecto a *dac* (B), así como la expresión aislada de *tkv* (C). El reporter lac-Z de *tkv* se expresa fuertemente en las LPCs, así como en la región del LF y la región de pre-ensamblaje de las neuronas de la lámina.

Dada la importancia de la vía Dpp en la formación y organización de los OLs nos propusimos analizar una posible conexión con nuestros genes de estudio (*hth*, *eya*, *so*, *dac*). El comienzo de la expresión de Dpp es muy temprano como ya se ha descrito, y como se puede observar en la Figura 29 donde también aparece la expresión de *eyes absent* en un globo óptico de estadio L2 tardío. Dado que ni *eyeless* ni *twin of eyeless* parecen ser los inductores directos de la expresión de los genes *hth*, *eya* o *so* en el OPC, durante el desarrollo larvario, ¿Podría ser la vía Wg, a través de la inducción de *dpp*, la desencadenante de su expresión y/o activación.? Para responder a esta pregunta, probamos a activar ectópicamente la vía Dpp induciendo clones FLP-OUT, en los cuales se expresó ectópicamente la forma constitutivamente activa del receptor de Dpp, *thick veins* (*tkv*), *Tkv<sup>QD</sup>*, y cuya expresión sabemos que abarca la región del OPC (Figura 30). Más concretamente, el dominio de expresión más fuerte de *tkv* se extiende desde la región de las LPCs hasta las células inmediatamente posteriores al LF, es decir, en el dominio de preensamblaje de las neuronas de la lámina (Figura 30).



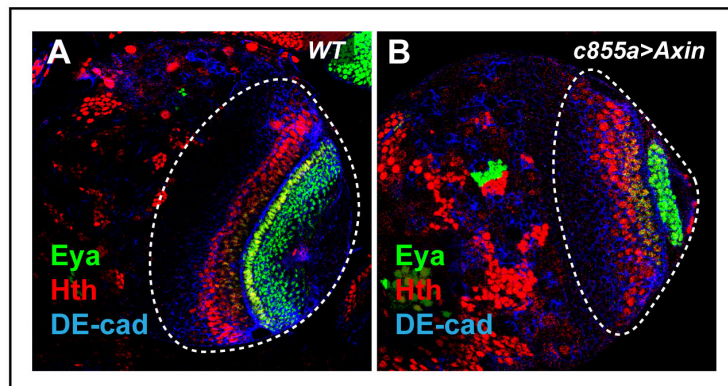
**Figura 31. Los clones de expresión ectópica de *tkvQD* experimentan un sobrecrecimiento del Ne, pero no afectan directamente a la expresión de *Hth* y *Eya*.** Vistas de la superficie superior (A, B) y vista de la superficie lateral (C) de OLs en fase tardía L3 y vista lateral dedonde se muestran clones de expresión de *tkvQD* marcados positivamente con GFP y teñidos para *Eya* y *Hth*. Se muestran los canales combinados. (A'-C' y A''-C'') Se muestran los canales individuales de las regiones encuadradas en (A-C) a mayor magnificación. La línea punteada amarilla marca los límites del clon que se ve representado en cada caso. En (A'') las flechas marcan la presencia de un nuevo LF dentro del clon. En (B') las flechas marcan la región del clon que sobresale de la región de la lámina, observándose así un acúmulo de células *Eya*+. En (C', C'') las flechas marcan como se genera un repliegue en la zona del clon. En (C) podemos observar toda la herradura que forma el OPC gracias a la orientación del OL, que permite una visión lateral del mismo.

En la Figura 31 podemos observar varios ejemplos de clones *Tkv<sup>QD</sup>*. El fenotipo de estos clones depende de la región donde se encuentre el clon y de las dimensiones de éste. Así en la Figura 31B, se observa que el clon abarca la región de la lámina donde se produce un acúmulo de células *Eya*+. Sin embargo, no se ve ninguna alteración en cuanto al patrón de expresión de *hth*. No obstante, en las Figura 31A y C, ambos clones se localizan en la región del Neuroepitelio donde se produce la proliferación celular y en este caso tanto *Eya* como *Hth* se ven afectados. La activación ectópica de la vía *Dpp* en el Neuroepitelio produce una especie de sobrecrecimiento que da lugar a repliegues del tejido donde nuevamente se expresan *eya* y *hth* en la misma organización, como si se



tratara de la inducción de nuevas regiones generadoras de lámina, pues se puede observar la aparición de un LF dentro del clon (flechas en la Figura 31A").

Por tanto, el efecto observado es más bien indirecto sobre *hth* y *eya*, y se debe a un sobrecrecimiento del tejido donde ambos se expresan normalmente. Esto concuerda con los fenotipos observados por Melissa A. Hayden y sus colaboradores al utilizar dobles mutantes del supresor de tumores APC, un regulador negativo de la vía Wg (Hayden et al., *Developmental Biology* 305 (2007) 358–376). Wg activa *dpp* en los globos ópticos como ya hemos comentado anteriormente y como sugieren Kaphingst y Kunes, *wg* podría actuar vía Dpp para inducir a la progenie del OPC a asumir sus respectivos destinos neuronales. Es decir, los clones inducidos en los que la vía Wg se activa permanentemente por falta de su supresor (APC), observaban un sobrecrecimiento que como consecuencia produce repliegues epiteliales fácilmente detectables utilizando el marcador DE-cad. (figura 4 de su trabajo publicado en *Dev Biol*, 2007).



**Figura 32. La expresión ectópica generalizada en el OPC de Axin, un inhibidor de la vía Wg, produce cambios morfológicos en el OL.** Vistas de la superficie superior de un OL *wild type* (A) en comparación con un OL donde se forzó la expresión de Axin utilizando el driver *c855a-G4* (B). En ambos casos se tiñeron para Eya, Hth y DE-cad. La región del OL está limitada por la línea discontinua. Observe el cambio de morfología de la región del OL entre (A) y (B) con respecto al CB. En (B), al haber un menor número en comparación con (A) de células del Ne y células precursoras de la lámina, así como neuronas de la lámina, el OL adquiere una morfología triangular, sin verse por ello afectados los patrones de expresión de *eya* y *hth*

Con respecto a la falta de función de *tkv*, los resultados observados hasta ahora en clones FLP-FRT de *tkv<sup>-</sup>*, no nos dan suficiente información para poder concretar el efecto que produciría anular la vía Dpp en las células precursoras de la lámina. Sería interesante cuantificar si se produce una disminución en la

proliferación celular, resultando un menor número de células precursoras de la lámina. También podría ocurrir que la falta de precursores en ciertas regiones se vea rescatada por células precursoras de regiones vecinas, sin observarse cambios apreciables en el número final de neuronas de la lámina. Es decir, una especie de selección negativa de las células que carecen del receptor tkv, al igual que ocurre a veces con las células *eya*-.

Otro aspecto que estudiamos fue la inhibición de la vía Wg en el OPC. Para ello utilizamos la línea *c855a-G4*, que se expresa en las células tanto del OPC como del IPC (Egger et al., 2007; Hrdlicka et al., 2002), y la cruzamos con una línea *UAS-DAxin*, con el objetivo de expresar la proteína Axin en todas las células del OPC. Axin es un regulador negativo de la vía de señalización de Wg. Se sabe que la sobreexpresión de Axin produce el mismo fenotipo que la pérdida de función de *wg*. Axin facilita la formación del complejo de degradación de Armadillo ( $\beta$ -catenina) e incrementa la fosforilación y degradación de la  $\beta$ -catenina citoplasmática, inhibiendo la vía de esta forma (Zeng et al., 1997; Amit et al., 2002).

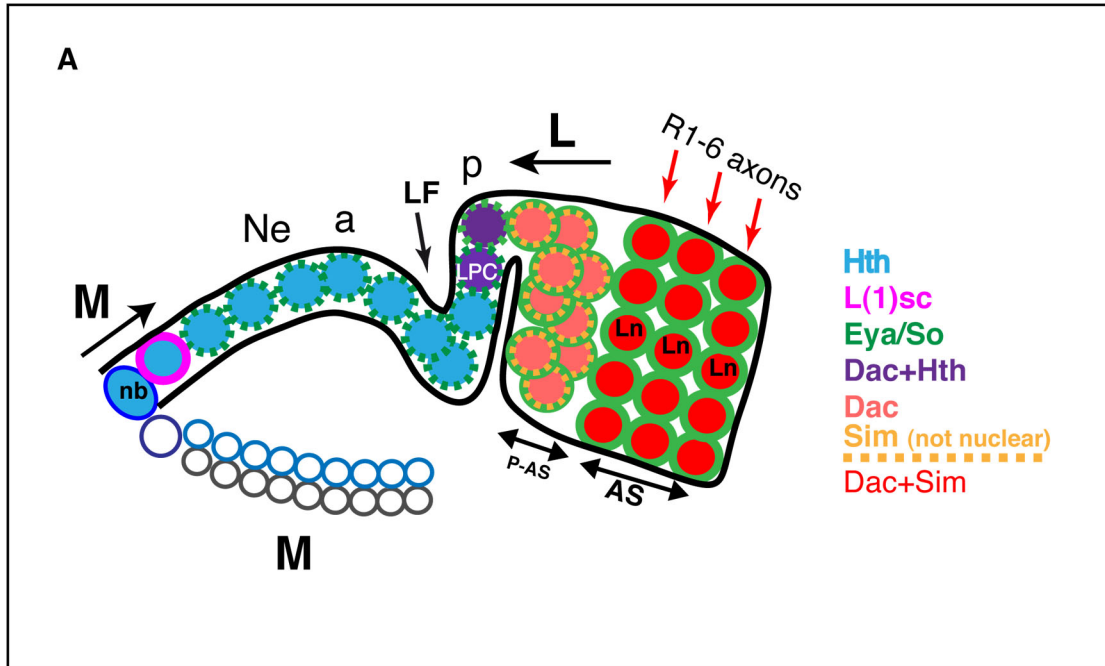
Aunque se trata de un experimento a groso modo, pudimos observar que si bien ni los niveles ni la distribución de las proteínas Hth y Eya variaban, la morfología del OL si se vió alterada, mostrando una superficie menor y una lámina de menor tamaño del correspondiente a su estadio larvario (Figura 32).

Así, una reducción en el tamaño del OL tiene como consecuencia un menor número de células en el neuroepitelio que expresen *eya* y *hth*, además de un menor número de células *eya*<sup>+</sup> en la lámina, probablemente por una reducción en el número de LPCs.

No podemos concluir si las vías Wg y/o Dpp tienen algún efecto directo sobre los genes *hth/eya/so/dac*, porque en cualquier experimento realizado para reprimir o sobreactivar la vía produce un dramático efecto sobre la proliferación y el crecimiento del Ne del OPC e IPC. Sin embargo, podemos sugerir que tanto la vía Wg como la vía Dpp no parecen tener un efecto directo sobre los genes *hth/eya/so/dac*, sino más bien un efecto indirecto debido a su papel en la regulación de la proliferación de las células del OL.

## 8. Modelo propuesto para el desarrollo larvario de la lámina.

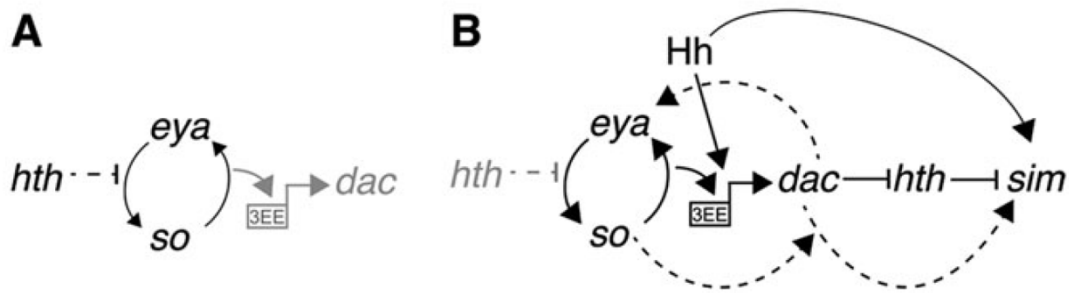
Con los resultados obtenidos en este trabajo hemos diseñado un modelo (Figura 33) en el que se muestran los patrones de expresión de los genes indicados en la figura, gracias a cuyo análisis hemos hallado que participan en el desarrollo de la lámina durante el estadio larvario. El modelo, además, muestra en un



**Figura 33. Modelo del desarrollo de la lámina.** La imagen es un resumen de los patrones de expresión de los genes que figuran en la leyenda de la derecha, en una sección esquemática a través de la médula (izquierda) y de la lámina (derecha). Las flechas marcadas por M y L indican el movimiento de las olas de diferenciación de la médula y la lámina, respectivamente. La línea punteada en verde indica un bajo nivel de expresión de Eya y So, que se intensifica, conforme las células entran en la región de la lámina (línea continua verde). Abreviaturas: NB: neurblastos; Ln: neuronas de la lámina; P-AS: dominio de pre-ensamblaje; AS: dominio de ensamblaje; LF: surco de la lámina; a: anterior; p: posterior; Ne: neuroepitelio. Los axones R1-6 que van entrando en la lámina están representados por las flechas rojas.

esquema de la sección de un OL, cómo ocurre el proceso de reclutamiento de las neuronas de la lámina, desde la región progenitora del neuroepitelio (Ne), y una vez las células pasan a ser precursores de la lámina, hasta la región de la lámina, donde se especifican como neuronas, y posteriormente son empaquetadas en el compartimento de ensamblaje para formar los cartuchos de neuronas de la lámina. En la Figura 34 se muestra, de forma esquemática, las interacciones reguladoras entre los genes que regulan la especificación de la lámina, mostrados en el modelo.





**Figura 34. Esquema de la red génica que controla la especificación de la lámina.** El esquema muestra la relación existente entre los diferentes genes que regulan la especificación de la lámina antes (A) y después (B) del surco de la lámina (LF). Antes del LF, las células del Ne co-expresan *hth*, *eya* y *so*. La línea de represión (terminada en T) está representada con una línea discontinua para indicar que el efector represor de *hth* sobre *eya* es débil (A). Tras el LF, la expresión de *dac*, requiere de *eya* y *so* de forma autónoma celular, tanto como de la liberación de Hh por parte de los axones de la retina. Esta activación podría estar regulada a través del *enhancer* *dac3EE* (3EE). Además, la expresión de *dac* es requerida para romper el equilibrio del bucle autorregulador entre *hth* y *eya/so* a favor de la completa activación de *eya/so* y la completa represión de *hth* (línea discontinua entre *dac* y *eya*) (B). La expresión de *Sim* dentro de la lámina requiere la señalización de Hh (Umetsu et al., 2006), así como de la represión de Hh mediada por *dac*, y al mismo tiempo, el aporte positivo de los RDGs (flecha discontinua desde el bucle autorregulador *eya/so* hacia el enlace entre *dac* y *sim*. Si este aporte la ejerce *dac* o no, no lo sabemos (línea discontinua desde *dac* a *sim*; B).

## DISCUSIÓN

Al comienzo de este capítulo, planteábamos la hipótesis de si los genes que forman la red génica altamente conservada durante el desarrollo de retina, tanto en vertebrados como en invertebrados, podrían participar también durante el desarrollo del globo óptico de *Drosophila*. De esta manera podríamos hablar de un ancestro común en cuanto al desarrollo de ojo entre vertebrados e invertebrados, como plantea Erlick en su hipótesis 2. Durante los estudios realizados, hemos desvelado la red génica reguladora que opera de forma autónoma celular durante la especificación de las neuronas de la lámina en el globo óptico. El modelo regulador que resulta de este trabajo se resume en el esquema de la Figura 33.

Con los resultados obtenidos se demuestra que la expresión de los genes RD *eya* y *so* son requeridos de forma autónoma celular para la especificación de las neuronas de la lámina, a través de la activación de, al menos, *dac* y *sim*. Su expresión es iniciada en las células del Ne a bajos niveles, pero su expresión se ve incrementada después del LF. El hecho de que *eya* y *so* se regulen mutuamente de forma positiva causaría, sobre cierto umbral de expresión, que *eya* y *so* llegaran a su nivel máximo de expresión. *hth* podría estar regulando este umbral, puesto que *hth* actúa *in vivo* como un represor de *eya* en los progenitores del Ne. La regulación de la expresión de *eya* podría ser posteriormente requerida para la segregación espacial de las células en diferentes estados a lo largo de la ruta de diferenciación de la lámina. Así, los clones *eya*- son recuperados rara vez en las regiones internas de la lámina (Figura 16A), lo cual podría ser indicativo de una exclusión del tejido mutante *eya*- o de la eliminación de estas células de la región de la lámina. Algo similar ocurre con los clones mutante *smo* y *sim*, los cuales tampoco aparecen en regiones internas de la lámina (Umetsu et al., 2006). Además, *hth* es requerido para mantener la proliferación normal de las células del Ne, así encontramos, que los clones mutantes para *hth* crecen, un promedio, de un 30% menos que los clones silvestres.

El reclutamiento de las células precursoras de la lámina desde los progenitores del Ne es dirigido por las sucesivas oleadas entrantes de axones R1-6, por tanto, acoplándose a la diferenciación de la retina (Selleck and Steller, 1991; Huang and Kunes, 1996). La proteína Hh liberada por los axones activa su vía de señalización corriente abajo y, como consecuencia, la expresión de *dac* es regulada positivamente en las células que expresan *eya* y *so* (Huang and Kunes, 1996; Chotard et al., 2005). En este trabajo se muestra que el resultado neto de esta activación es una represión eficiente de *hth* para permitir la expresión de *sim* y, por tanto, la diferenciación normal de la lámina. Se ha demostrado que *dac* y sus homólogos, los genes Dach, forman un complejo proteico con las familias de proteínas So/Six y Eya (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997; Ikeda et al., 2002) y que actúa de forma sinérgica con ellas en los ensayos de inducción ectópica de ojo (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997). Además, Dac posee un dominio de unión al ADN (Kim et al., 2002). El hecho de que la expresión ectópica de *dac* no parece ser capaz de reprimir *hth* sin Eya sugiere que esta función requiere la formación de un complejo trimérico con So y Eya. *hth*, *eya*, *so* y *dac* se co-expresan transitoriamente en algunas células de la cuesta posterior del LF, antes de que *hth* sea apagado. Esta región posterior podría representar una región de transición en la que estos procesos de regulación tienen lugar (Figura 33). Con respecto a la activación de la expresión de *sim*, no hemos podido determinar claramente si puede ser llevada a cabo sólo mediante Dac o mediante el complejo So-Eya-Dac, aunque la limitada evidencia que tenemos es compatible con el hecho de que Dac requiera la cooperación de Eya/So.

En el desarrollo del ojo compuesto, los progenitores se caracterizan por la expresión de *hth*, mientras que las células precursoras (contenidas en el dominio conocido como proneural, PPN) expresan altos niveles de *eya*, *so* y *dac*, y no expresan *hth* (Bessa et al., 2002). Sin embargo, una inspección detallada del dominio progenitor de ojo muestra que las células que expresan *hth* también coexpresan genes RD, tales como *eya*, aunque a bajos niveles (Figura 14), como se demuestra en este capítulo que ocurre en el caso de los progenitores del Ne en el OL. Por tanto, el ojo y la lámina derivan de progenitores que muestran remarcables similitudes. Sin embargo, también hay que resaltar las diferencias encontradas. Ni *ey*, ni *toy*, los dos genes Pax6 posicionados encima de la

jerarquía genética del desarrollo de ojo, se expresan durante el desarrollo de la lámina (Callaerts et al., 2001; Morante et al., 2011)(Figura 7), y toda la información disponible sobre *ey*, incluidos los mutantes de *ey* (Callaerts et al., 2001), la expresión de formas dominante negativas para *ey* (Morante et al., 2011) o los knock-downs de *ey* y *toy* mediados por ARNi (nuestros propios datos, no mostrados), es compatible con el hecho de que estos genes no estén jugando un papel directo en el desarrollo de la lámina, al menos durante los estadíos larvarios. Lo mismo ocurre con el gen *tsh* y su parólogo *tio*, ambos son genes tempranos durante el desarrollo de ojo y ninguno es expresado en el neuroepitelio del OPC (no mostrado), aunque sus células son capaces de responder a la expresión de *tsh*, estimulando la proliferación y bloqueando la diferenciación de la lámina (Figura 9). Puesto que en el ojo se ha demostrado que *tsh* y *hth* interactúan directamente con Yki para activar los genes diana regulados por Hippo (Peng et al., 2009) y la proliferación en el OPC es controlada por la vía Hippo (Redy et al., 2010), proporcionando *tsh* es probable que también se promueva que *hth* y *yki* mantengan el estado proliferativo de las células neuroepiteliales (ver Figura 9).

Un reciente análisis de expresión realizado en el laboratorio donde se ha llevado a cabo esta tesis, muestra un dato interesante: *Optix* se expresa en los OLs durante el desarrollo larvario (datos de M<sup>a</sup> Angeles Dominguez-Cejudo, no mostrados). Su expresión en el OL, parece ser bastante similar a la de *eya/so* en la región del OPC, sin embargo, *Optix* no se expresa tan cerca de los extremos de la herradura. *Optix* es un miembro de la familia génica *Six/so* y concretamente es el ortólogo en *Drosophila* de la subclase *Six3* de ratón, así como *sine oculis* es el ortólogo de la subclase *Six1*. La expresión de *Optix* es diferente a la de *so*, aunque tienen patrones solapantes en el ed, *Optix* se expresa en la región anterior al MF (Seimiya y Gehring, 2000; datos no publicados de C.M. Luque y F. Casares), región donde se encuentran los progenitores y precursores de la retina. Si bien, la expresión de *eyeless* es más temprana que la de *Optix*, éste no parece ser inducido por *ey*, sino más bien su expresión es independiente de *ey* (Seimiya y Gehring, 2000), a diferencia de lo que ocurre con *so* (Halder et al., 1998). De hecho, *Optix* es capaz de inducir ojos ectópicos en un fondo mutante para *ey* en la región de la antena, aunque su eficiencia sea menor que la generada por la expresión ectópica de *ey*. Se sabe que *Optix*

no interacciona con Eya, a pesar de tener un dominio Six, de manera que la sobreexpresión conjunta de Eya+Optix no genera una mayor eficiencia en la generación de ojos ectópicos (Seimiya y Gehring, 2000). El hecho de que Optix sea un gen temprano de ojo, capaz de inducir ojo ectópico y que no requiera la presencia de ey, nos hace pensar que podría ser un candidato para ocupar la posición inicial de la cascada de señalización que active los genes *hth/so/eya* durante el desarrollo del OL. Sería necesario realizar un estudio de su patrón de expresión en el OL en estadíos larvarios tempranos (L1, L2) para ver cuando comienza su expresión y si es anterior a la aparición de estos genes. Sería ideal el estudio de clones mutantes Optix, con el fin de ver su efecto sobre estos genes y sobre el desarrollo de OL en general, pero por desgracia, hasta la fecha, no se dispone de un mutante para este gen.

Otra diferencia significativa entre el desarrollo de la lámina y del ojo es que, durante el desarrollo de ojo (retina), *hh* no regula la expresión de *hth*, al menos directamente, porque el bloqueo de la vía *hh* en clones *smo*- no afecta el patrón de *hth* (Firth y Baker, 2009; Lopes y Casares, 2010). En el ojo, el papel represivo de *hth* se ha demostrado que es llevado a cabo mayormente por el homólogo de BMP2, Dpp (Lopes y Casares, 2010), el cual es en si mismo una diana de *hh* (Herbelein et al., 1993; Greenwood y Struhl, 1999; Fu y Baker, 2003). En los OLs, varios trabajos han demostrado que Dpp juega un papel significativamente diferente: en la especificación de la glia de la lámina (Yoshida et al., 2005) y en la proliferación del OPC (Kaphingst y Kunes, 1994; Hayden et al., 2007). De hecho, en los resultados aquí mostrados, no vemos una alteración en el patrón de expresión de *hth* o de los genes RD cuando sobreactivamos la vía Dpp en el OPC, sino más bien lo que se observa es la formación de unos pliegues por el sobrecrecimiento del Ne del OPC (Hayden et al., 2007) (Figura 31, A y C).

Quizás la diferencia más llamativa resida en el papel jugado por *dac*. En el ojo, *dac* es requerido para la iniciación de la diferenciación de la retina; sin embargo, una vez que la onda de diferenciación está avanzando, quitar *dac* tiene poco efecto en el proceso (Mardon et al., 1994). Por consiguiente, los clones *dac*- no des-reprimen *hth* (C. Bras-Pereira y Fernando Casares, no publicado). Por contra, *dac* es necesario para la correcta diferenciación de la

lámina, donde es requerido para la represión de *hth*. Los resultados de este trabajo, en el cual se muestra que en los clones mutantes de *dac* se pierde la expresión de *sim*, están en contraposición con los resultados aportados por Umetsu y colaboradores (Umetsu et al., 2006) quienes no encontraron efecto alguno sobre *sim*, tras eliminar *dac*. Si bien, hay que destacar, que mientras los clones aquí mostrados (Figura 26C) fueron inducidos utilizando una flipasa inducible por *heat-shock* (*hs-flp*), los clones de Umetsu y colaboradores fueron inducidos con una línea Gal4 (*NP6099-Gal4*; Yoshida et al., 2005) dirigiendo un *UAS-flp*, lo cual puede causar un fenotipo más suave debido al retraso en la inducción de los clones. Esto podría resultar solamente en una reducción muy sutil de la expresión de *sim* y podría haber sido obviado en el anterior artículo. Además en el apartado 6 de este capítulo, no sólo observamos la pérdida de *sim* en clones *dac*- sino también en el caso de clones ARNi para *so* (Figura 26A), incluso en la ausencia de su represor *hth* (Figura 26B) y también en clones mutantes de *eya* (no mostrado), vemos la pérdida de *sim*. Teniendo en cuenta que en estos clones se pierde la expresión de *dac* (Figura 16), la pérdida de *sim* en estos clones es otro punto más que apoya nuestros resultados. Si bien, *sim* podría estar requiriendo un *input* positivo de *eya/so* directamente. Aún así, esto unido al hecho de que *hth* es capaz de reprimir *sim* y que *dac* es capaz de reprimir a *hth*, da sentido al hecho de que en ausencia de *dac*, *hth* sea de-reprimido, como ya hemos observado en clones *dac*- y, por consiguiente, en presencia de su represor, *Sim* no esté presente.

El uso del cassette *hth/eya/so/dac* parece estar evolutivamente conservado, como los genes de las familias Pax, Six, Eya, Dach y en algunos casos, Meis se ha visto que son coexpresados y funcionales durante el desarrollo de muchos tipos diferentes de órganos en vertebrados: desde ojos, placas sensoriales o regiones cerebrales, hasta musculos, riñones o páncreas (Ikeda et al., 2002; Zhang et al., 2002; Li et al., 2003; Bessarab et al., 2004; Purcell et al., 2005; Zhang et al., 2006; Bumsted-O'Brien et al., 2007; Kaiser et al., 2007; Erickson et al., 2010; Santos et al., 2011). Por tanto, estudios futuros de el desarrollo temprano de la lámina pueden arrojar algo de luz a los principios generales gobernados por este cassette genético multifuncional también en vertebrados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las larvas utilizadas en cada experimento fueron crecidas a 25°C a menos que se indique lo contrario. Como stock control silvestre se utilizó *w<sup>1118</sup>*. Como línea reportera de la expresión de *dac* se utilizó: *P {PZ}dac P(ry<sup>+</sup>)/Cyo; ry<sup>506</sup>*, como línea reportera de *tkv* se utilizó: *tkv-lacZ/Cyo* de Hernesto Sanchez Herrero, para seguir la expresión de *dpp* se utilizó: *yw;;dpp-lacZ* (Bloomington 8412), para seguir la expresión de *hh* se utilizó la línea: *hh-Gal4/TM2* de Joaquim Culí y como línea reportera de la expresión de *ptc*, se utilizó: *ptc-lacZ* y para la expresión de *ey* se utilizó la línea: *ey-lacZ* (II) (Czenry et al., 1999). Para la expresión ectópica dirigida utilizamos el sistema UAS/GAL4 (Brand and Perrimon, 1993). Las líneas UAS empleadas fueron: UAS-ds-*eya* (UAS-*eya*-RNAi; VDRC 43911), UAS-ds-*so* (UAS-*so*-RNAi; VDRC 104386), UAS-ds-*hth* (UAS-*hth*-RNAi; VDRC 12764, UAS-GFP-*hth* (Casares and Mann, 2000), UAS-Flag-HA-*eyaB2* and UAS-Flag-HA-*tsh* (ambos cedidos amablemente por CM Luque), *yw;;UAS-tkv<sup>QD</sup>/TM6B* (Nellen et al., 1996), UAS-DAxinA2-24 (Willert et al., 1999), UAS-*dac* and UAS-HA-*dac* (Shen and Mardon, 1997); Tavsanlı et al., 2004 ) and UAS-GFP (Bessa and Casares, 2005). Los clones de células mutantes para *hth* (*hth<sup>P2</sup>*), *smoothened* (*smo<sup>3</sup>*), *eya* (*eya<sup>E8</sup>*) and *dac* (*dac<sup>3</sup>*) fueron generados por recombinación mitótica (Xu and Rubin, 1993). Estos alelos han sido descritos en Flybase. Los clones fueron inducidos mediante un choque térmico (HS) a 37°C durante 30' entre las 48h y 72h tras la puesta del huevo (AEL) en larvas de los siguientes genotipos: *yw, hs-flp122;; FRT82B hth<sup>P2</sup>/FRT82B Ubi-GFP*, *yw, hs-flp122; eya<sup>E8</sup> FRT 40A/ Ubi-GFP FRT40A*, *yw, hs-flp122, smo<sup>3</sup> FRT40 /Ubi-GFP FRT40A* and *yw, hs-flp122; dac<sup>3</sup> FRT40/ Ubi-GFP FRT40A*. En todos estos casos, las células mutantes fueron marcadas por la ausencia de GFP. Con el objetivo de dar una mayor ventaja de crecimiento a las células mutantes *hth<sup>P2</sup>*, los clones *hth<sup>P2</sup>* fueron inducidos haciendo uso de la técnica Minute (Morata and Ripoll, 1975). Los clones se indujeron en larvas *yw, hs-flp; FRT82B hth<sup>P2</sup>/ FRT82B arm-lacZ, M(3)w<sup>124</sup>* mediante un tratamiento de choque térmico a 37°C durante 30' entre las 48h y 72h AEL. Los clones fueron detectados por la ausencia de β-galactosidase.

Los clones de expresión ectópica fueron generados de forma aleatoria empleando el método flip-out (Struhl and Basler, 1993). Hembras vírgenes *yw,hs-flp122, act>y>Gal4;;UAS-GFP/TM6B,Tb* se cruzaron con machos

llevando las determinadas construcciones transgénicas UAS (ya fueran homocigotos o balanceadas sobre *TM6B, Tb*). Los clones fueron inducidos entre las 48h y 72h AEL mediante tratamiento de choque térmico de 35'5°C durante 10'. En el caso de las líneas *UAS-RNAi*, tras el tratamiento HS las larvas fueron crecidas a 29°C para optimizar la expresión del transgen. Exceptuando esto, los cultivos se mantuvieron a 25°C. Para inducir clones dentro de la región de la lámina el tratamiento HS se llevó a cabo entre las 72h y 96h AEL. Se seleccionaron las larvas *No-Tb* para su disección y análisis. Los clones se detectaron por la presencia de GFP.

### Construction de la línea transgénica *dac3EE-Z*

Esta construcción fue generada por la Dra. Carla Lopes postdoc del laboratorio del Dr. Fernando Casares, dentro de uno de sus proyectos de líneas transgénicas, quien me cedió una copia para mis experimentos. La región genómica que contiene el enhancer *dac3EE* (Pappu et al., 2005) se amplificó por PCR, se clonó en el vector TOPO y se transfirió a un vector *attB*-pRVV-lacZ (Proporcionado amablemente por R. S. Mann, Columbia University). La construcción *attB* se insertó en el segundo cromosoma, en el sitio 22A *attP*, por transgénesis mediada via *phi-C31* (Bischof et al., 2007). Los cebadores utilizados fueron: 5'-gatcccaaaaaggacatcttcaa-3' and 5'-tcgaatgcaattttaacagaaaaa-3'. Se utilizaron técnicas genéticas estandar con el objetivo de introducir la línea *dac3EE-Z* en los apropiados fondos genéticos.

### Inmunohistoquímica

Los discos imaginales de ojo, así como los cerebros fueron disecados y fijados de acuerdo con los protocolos estandar. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: *guinea-pig* anti-Hth, 1/2000 (Casares and Mann, 1998), *rabbit* anti- $\beta$ -galactosidase, 1/1000 (Cappel), *rabbit* anti-GFP, 1/1000 (Molecular probes), *guinea-pig* anti-So, 1/1000 (Jemc and Rebay, 2007), *rabbit* anti-Toy, 1/50 (Jacobsson et al., 2009), *rat* anti-Ey, 1/100 (Halder et al., 1995), *rat* anti-L(1)sc, 1/100 (cedido por M. Dolores Martín Bermudo, CABD, Seville) y *mouse* anti-Sim, 1/50 (gift from A. Baonza, CBMSO, Madrid). *Mouse* anti-Eya, 1/100 (*eya10H6*), *rat* anti-DE-cad, 1/100 (DCAD2), *rat* anti-Elav, 1:1000 (7EBA10), *mouse* anti-Dac, 1/100 (mAbdac 1-1), *mouse* anti-22c10 (1/100), *mouse* anti-Wg (4D4), and *mouse*



anti-Ci, 1/5 (mAb2A1) fueron de Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa University). Los anticuerpos primarios se incubaron en PBS con 0.2% TritonX-100. Los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos fueron de Molecular Probes. Como marcador nuclear utilizamos 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), 1/10.000 de Fluka. Las imágenes fueron obtenidas con los sistemas confocales de Leica SPE o SP2 y procesadas con el software Adobe-Photoshop.

**Mediciones de las señales de fluorescencia.** Con el objetivo de determinar si se detectaban cambios cuantitativos en la expresión de genes en los clones de ganancia o pérdida de función, medimos la señal de inmunofluorescencia dentro de los clones y en las áreas circundantes (control) para correlacionar los niveles de expresión. Para su realización, las imágenes RGB se abrieron con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El área de interés (el clon marcado o la región vecina de tejido silvestre) fue marcada utilizando la herramienta de selección libre. Posteriormente, utilizando el "plug-in" "Analyze: Measure RGB", se midió la intensidad media de la señal para el canal deseado. Cada clon fue comparado con un parche de tejido silvestre vecino de área similar.

# CAPITULO 2

## Estudio de la familia génica de Fezf, un factor de transcripción con 6 dominios Zn-finger

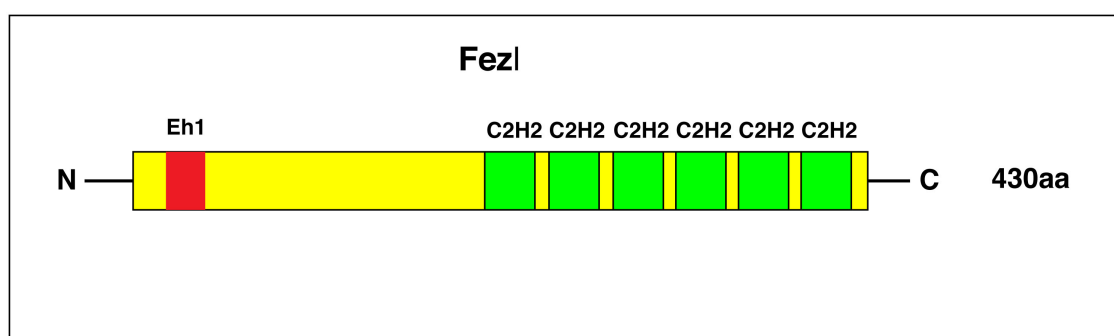
### PRIMERA PARTE

*Fezf* realiza una función esencial en el establecimiento de las subdivisiones del diencefalo de vertebrados, así como del posicionamiento de la *Zona Limitans Intrathalámica* (ZLI). Estudio del origen evolutivo de la ZLI y del papel de *Fezf* en invertebrados.

### INTRODUCCIÓN

En el año 2000, Matsuo-Takasaki y colaboradores identificaron y clonaron el gen *Fez* (*forebrain embryonic zinc-finger*) como un nuevo factor de transcripción *zinc-finger* (C2H2) específico del lóbulo frontal del cerebro y de las neuronas sensitivas olfatorias (OSNs) de *Xenopus*. En *Xenopus* *fez* se expresa en la placa neural anterior a comienzos del estadio 12, y más tarde durante el estadio 45 del desarrollo embrionario, se expresa también en varias regiones del telencéfalo, incluyendo los bulbos olfatorios y la zona ventricular (Matsuo-Takasaki et al., 2000). En el mismo año, Hashimoto y colaboradores encontraban en el pez cebra (*Danio rerio*) el gen homólogo al gen *fez* de *Xenopus*, al que llamaron *fez-like* (*fezl*), por las semejanzas en cuanto a su secuencia proteica con aquél. Hoy día, se sabe que son dos genes los que componen la familia génica *Fezf* en vertebrados y que el llamado *fezl* corresponde a *Fezf2*. Estos genes están altamente conservados, entre invertebrados p.ej. *Drosophila*, *Platynereis*, etc., y vertebrados como *Xenopus*, pez cebra (ZF), ratón y cómo no, en humanos. En *Drosophila* la familia contiene un solo gen *Fez* llamado *Dfez/Earmuff* (Pfeiffer et al., 2008; Weng et al., 2010). Si bien los genes de esta familia presentan 6

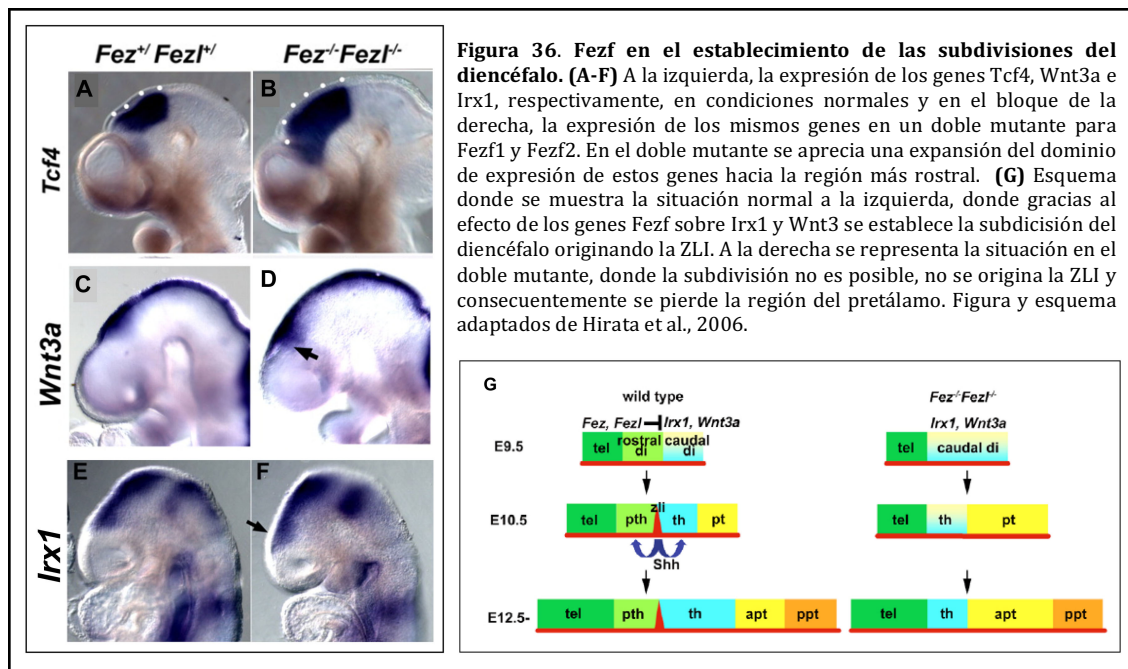
dominios C2H2 *zinc-finger* en el extremo carboxilo terminal (Hashimoto et al., 2000), no está estrechamente relacionada con otros genes *zinc-finger* (a nivel de secuencias conservadas) para los que se ha descrito un papel en el desarrollo neural temprano (Nakata et al., 1998; Brewster et al., 1998; Kuo et al., 1998; Mizuseki et al., 1998). Además, en la secuencia de aminoácidos, los genes de la familia *Fezf*, presentan un motivo represor Eh1 (Engrailed homology 1) en la región amino terminal (Hashimoto et al., 2000), el cual interacciona con la familia de co-represores transcripcionales Groucho/TLE, de forma similar al dominio represor de varios represores transcripcionales (Bae et al., 2003; Kobayashi et al., 2001; Muhr et al., 2001; Shimizu et al., 2002), sugiriendo una función de represor transcripcional para *Fezf*.



**Figura 35. Dominios conservados de la proteína *Fezf*.** La longitud de la secuencia de aminoácidos puede variar entre especies. Las regiones altamente conservadas son los 6 dominios C2H2 *zinc-finger* (verde) en el extremo carboxilo terminal y el dominio homólogo al dominio represor de Engrailed, Eh1 (rojo)

Varios son los trabajos publicados sobre *Fezf* desde que se clonara por primera vez en *Xenopus*, y buena parte de ellos hacen referencia a su función en el establecimiento del eje anteroposterior (A-P) durante el desarrollo del cerebro de vertebrados. Ambos genes *Fezf1* y *Fezf2* se expresan de forma solapante en el lóbulo frontal del cerebro y los dobles mutantes muestran defectos en el patrón rostro-caudal del diencefalo. El primer trabajo en el que se habla de *Fez* y *Fez-like* como una familia génica fue publicado por Hirata y colaboradores (Hirata et al., 2006), en el que muestran que en ratón estos genes son redundantes, y en los dobles mutantes se observa un marcado fenotipo que afecta a las subdivisiones del diencefalo. La función de estos genes es esencial para reprimir la formación del diencefalo caudal en la región rostral del mismo, de manera, que la formación de la zona *limitans intratalámica* (ZLI) depende de estos genes. La ZLI es uno de los más importantes organizadores secundarios durante el desarrollo del cerebro de vertebrados y se localiza entre el pretálamo

(tálamo ventral) y el tálamo (tálamo dorsal) (Larsen et al., 2001; Shimamura et al., 1995). En ausencia de estos genes, los marcadores que se expresan en el límite caudal de la ZLI, como *Tcf4* (Figura 36A), *Wnt3* (Figura 36C), o *Irx* (Figura 36E), se desplazan a una región más rostral como consecuencia de una reducción de la región rostral del diencefalo y una expansión caudal del mismo (Figura 36B, D y F, respectivamente).



Un efecto similar fue observado por Jae-Yeong Jeong y colaboradores (Jeong et al., 2007) en pez zebra (*Danio rerio*). En este organismo modelo, *fezl* se expresa en la región de los futuros telencéfalo, diencefalo y en el hipotálamo, justo después de la gastrulación. La actividad reducida de *fezl* resulta en un déficit del pretálamo y una correspondiente expansión de la zona caudal del diencefalo. La sobreexpresión de *fezl* mediada por el sistema Gal4-UAS en gástrula tardía es capaz de expandir el pretálamo, el nervio óptico, telencéfalo y el hipotálamo a expensas de los ojos, la ZLI y la región posterior del lóbulo frontal e incluso parte del mesencéfalo. El alargamiento de estas subdivisiones del lóbulo frontal es precedido por una supresión temprana de la expresión de *wnt* en la región del futuro diencefalo. De hecho, se sabe que el gen *fezl* de pez cebra es inducido por *Dkk1* (Hashimoto et al., 2000), una proteína de secreción antagonista de la vía Wnt (Glinka et al., 1998). Así, los experimentos realizados por Jae-Yeong Jeong y colaboradores (Jeong et al., 2007), en cuanto a ganancia de función de *fezl* (GOF) demuestran la capacidad de *fezl* para

reprimir *wnt1* y *pax2a*, lo cual es seguido por una pérdida de los dos organizadores importantes, la ZLI y el *midbrain-hindbrain boundary* (MHB). Esto parece indicar que *wnt* y *fezf* se reprimen mutuamente, ya sea directa o indirectamente.

Lo mismo fue verificado para *Xenopus* en 2009 por Elisa Rodriguez y colaboradores (Rodriguez-Seguel et al., 2009), durante su estudio de los genes *lrx* y su importancia en el establecimiento del límite entre el pretálamo y el tálamo, es decir en el establecimiento de la ZLI. Analizaron mediante experimentos de pérdida (*knockdown*) y ganancia de función (sobre-expresión) la función de los genes *lrx* individualmente o en combinación y observaron que estos genes tienen una función esencial y parcialmente redundante en el desarrollo neural. Así mismo, observaron que la expresión de los genes *lrx* limita con el dominio de expresión de *Fezf* justo en la región de formación de la ZLI. Hicieron un exhaustivo análisis de la expresión de los genes *Fezf1/2* e *lrx1/3* en diversas situaciones en las que inyectaban diferentes construcciones de los genes *Fezf* e *lrx* (con dominio represor En1 y otra con dominio activador VP16). Todos los estudios llevaron a la conclusión de que los genes *Fezf* e *lrx* se reprimen mutuamente de una forma directa (Rodriguez-Seguel et al., 2009) y es esta represión mutua, la que establece la posición del dominio en el que se desarrolla la ZLI.

Esta es una de las funciones conocidas más importantes de *Fezf*, ya que los organizadores morfogenéticos secundarios se localizan en los límites de los compartimentos principales del cerebro de vertebrados, y juegan papeles esenciales en el desarrollo del complejo cerebro de este grupo. Los dos organizadores internos principales del cerebro son el *isthmus organizer* (IsO) y la *zona limitans intrathalamica* (ZLI). El IsO se localiza en el límite entre el mesencéfalo y romboencéfalo (también conocido como: *midbrain-hindbrain boundary*, MHB), en la región donde limitan los patrones de expresión de *Otx* (*orthodenticle*) y *Gbx* (*Gastrulation brain homeobox*), y la ZLI se desarrolla dentro del diencéfalo, entre el pretálamo y el tálamo, en el límite de los dominios de expresión de los genes *Fezf* e *lrx* (Figura 37). Como es típico para los organizadores, las células de estas estructuras son la fuente de factores señalizantes difusibles que determinan el desarrollo posterior de los

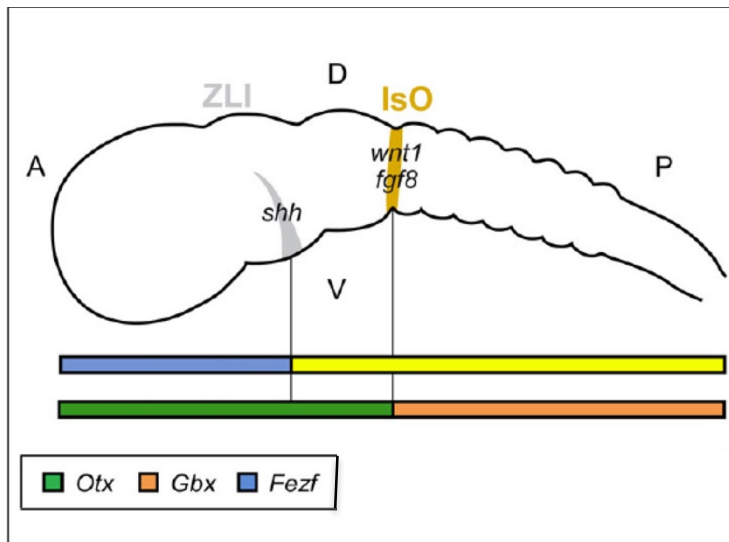
compartimentos celulares adyacentes. Las células de la ZLI secretan de forma característica *Shh* (Kiecker y Lumsden, 2005; Scholpp et al., 2006), mientras que las IsO típicamente liberan *Fgf8* y *Wnt1* (S. Martinez, 2001).

Una característica fundamental del cerebro de cordados es que tienen una organización tripartita caracterizada por las regiones de expresión de los genes *Otx*, *Pax 2/5/8* y *Hox* (Wada et al., 1998). Esta organización tripartita subdivide al cerebro longitudinalmente en tres regiones: lóbulo frontal, mesencéfalo y romboencéfalo (Figura 38). El lóbulo frontal, caracterizado por la expresión de *Otx* está a su vez subdividido en la región del telencéfalo y el diencéfalo por la presencia de la ZLI, región donde limitan la expresión de los genes *Fez* e *lrx*, en la región anterior y la región posterior, respectivamente (Figura 37). En la región del IsO se expresan los genes *Pax2/5/8* y en la región anterior al IsO (mesencéfalo) se expresa *Otx* mientras que en la región posterior al IsO (romboencéfalo) se expresan los genes *Hox* (Ver Figura 37).

Los centros organizadores IsO (MHB) y ZLI están presentes en todos los vertebrados, incluyendo los agnatos basales vivos (Osorio J et al., 2005; Murakami Y et al., 2005; Murakami & Kuratani) sin embargo, la ausencia de morfógenos clave en posiciones topológicamente análogas (Lowe CJ et al., 2006; Holland LZ et al., 2008) sugiere que los centros de señalización comparables no están presentes en invertebrados con un Sistema Nervioso Central, incluidos los amphioxos, un cordado basal que se considera el más próximo ancestro de los cordados (Murakami Y et al., 2005). A pesar de la carencia de los organizadores internos del cerebro en invertebrados, observaciones previas sugieren que la interfase entre los dominios de expresión limitantes de los genes *Otx/otd* y *Gbx/unpg*, los cuales determinan la posición del MHB (JP Martinez Barberá et al., 2001; A Simeone, 2000; KM Wassarman et al., 1997) (Figura 37), además de *Six3* que limita con *Otx/otd* para definir la región más anterior de la placa neural (Patrick et al., 2010), son ancestrales a todos los bilaterales (Hirth et al., 2003; Castro LFC et al., 2006; Patrick et al., 2010).

De este modo, existen evidencias en *Drosophila* de la existencia de una organización tripartita del cerebro, ya que no sólo se encuentra analogía en las posiciones de los dominios de expresión limitantes de los genes *Otx/otd* y *GBx/unpg* y la represión mutua que ejerce uno sobre el otro (Hirth et al., 2003),

sino que además los genes de *Drosophila* ortólogos a *Pax 2/5/8*, llamados *Pox neuro* (*Pox-n*) y *Drosophila Pax2* (*DPax2*) (M. Noll, 1993) se expresan en el cerebro embrionario de la mosca en una región del límite transversal posterior al dominio de expresión de *otd*, en el deutocerebro y anterior al dominio de expresión de los genes homeóticos (*Hox*)



**Figura 37. Vista esquemática de un SNC generalizado de vertebrados.** Imagen de M. Irimia (M. Irimia et al., 2010). Localización topológica de los organizadores, la ZLI y el IsO y los genes clave que determinan su posición en una vista esquemática del desarrollo de un sistema nervioso central generalizado de vertebrados. El más anterior de los organizadores secundarios del cerebro, la ZLI, se desarrolla dentro del diencefalo, en la interfaz de la expresión de *Fezf* (azul) e *Irx* (amarillo). El IsO está localizado en el límite entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (MHB), delimitado por la expresión de los miembros de las familias génicas de *Otx* (verde) y *Gbx* (naranja). D: dorsal; V: ventral; A: anterior; P: posterior.

en el tritocerebro. Este dominio transversal es la región del límite deutocerebral-tritocerebral (deutocerebral-tritocerebral boundary DTB) (Figura 39) (Heinrich Reichert, 2005). La expresión de estos genes demuestra una disposición análoga a la de sus ortólogos en el cerebro de vertebrados. Por contra, mucho menos se sabe sobre el origen evolutivo de la ZLI, así como la relación evolutiva entre los dos centros organizadores físicamente relacionados.

Como ya hemos mencionado previamente, *Fezf* se expresa en la parte más anterior del cerebro, y su expresión más caudal coincide con el límite anterior dominio de expresión de los genes *Irx*. La interfase de los dominios de expresión de *Fezf* e *Irx* delinea el borde entre el pretálamo y el tálamo en el diencefalo de vertebrados, y la posición en la cual se forma la ZLI (Figura 37). Dada la falta de estudios en el origen de la ZLI en organismos que no sean vertebrados, nos propusimos estudiar en *Drosophila*, como ejemplo de invertebrado protóstomo, la relación entre la expresión del gen *Dfez/Earmuff* y los genes *Irx*. Este estudio formó parte de una colaboración con los grupos de Jordi García-Fernández y

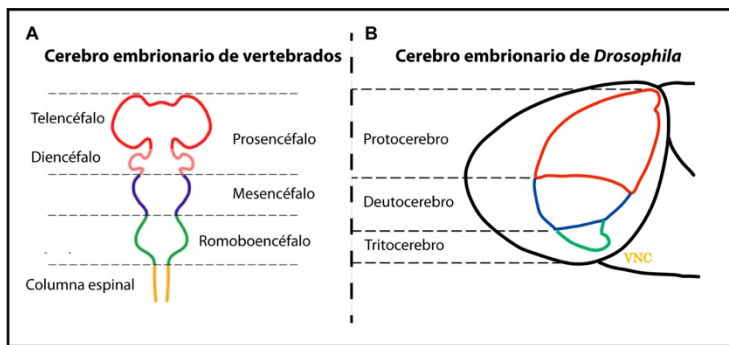
Jose Luis Gómez-Skarmeta, fruto de la cual se publicó el artículo "Conserved developmental expression of *Fezf* in chordates and *Drosophila* and the origin of the *Zona Limitans Intrathalamica* (ZLI) brain organizer" (Irimia et al., 2010).



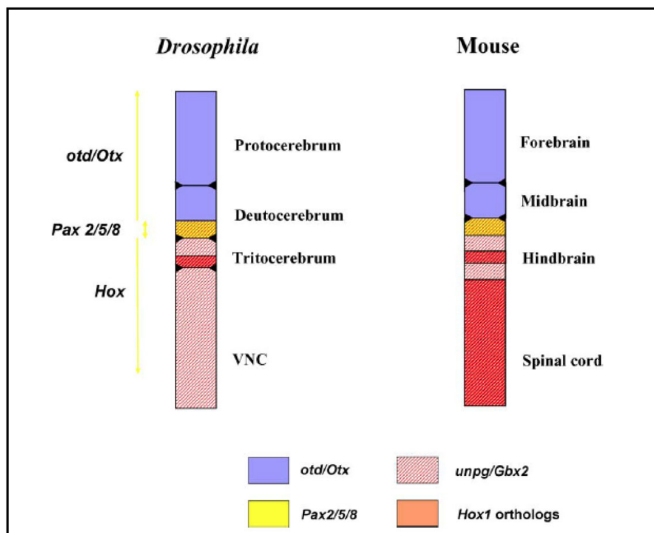
## RESULTADOS

### 1. Expresión relativa de los homólogos de los genes *Fezf* e *Irxf* en el SNC en desarrollo de *Drosophila*.

El cerebro de *Drosophila* presenta una estructura tripartita al igual que el cerebro de vertebrados (Hirth et al., 2003) y cada una de las partes reciben el nombre de protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. Teniendo en cuenta los marcadores *otd*, *unpg*, *Pax2/Pox-n*, y los homólogos de los genes *Hox* de vertebrados, estas regiones se corresponden con las divisiones de vertebrados: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, como se indica en la Figura 38 y Figura 39.

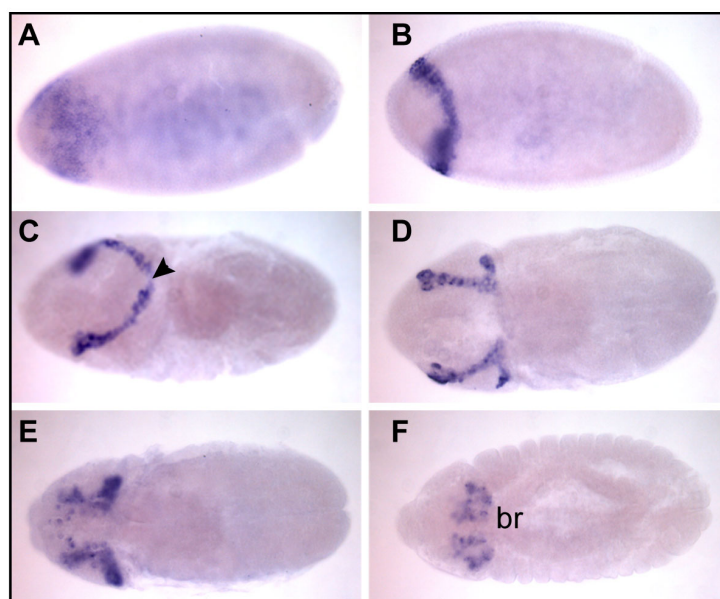


Hasta este trabajo no se había estudiado el patrón de expresión relativa de los genes *Dfezf* e *Irxf* en el cerebro de *Drosophila* durante el desarrollo embrionario. Este fue nuestro propósito inicial, cuyos resultados fueron publicados (M. Irimia et al., 2010). En *Drosophila* existe un sólo gen *Fezf*, también conocido como *Dfezf* o *Earmuff*.



Como en cordados, la expresión de *Dfezf* está restringida a la región más anterior del SNC del embrión de la mosca a lo largo de su desarrollo temprano (Pfeiffer et al., 2008; Irimia et al., 2010). La expresión de *Dfezf* comienza en el embrión en estado de blastodermo como una franja dorsal y lateral en la región anterior (región neurogénica procefálica) del blastodermo (Figura 40A-B).

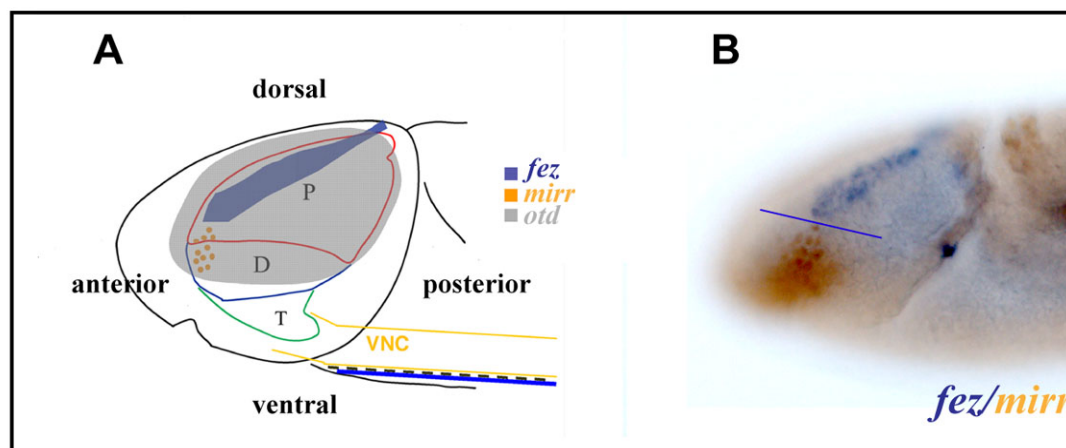
De forma característica, los extremos laterales de esta franja se ensanchan, haciendo que el patrón se asemeje a unas orejeras (earmuffs) (Figura 40C). Durante el estadio embrionario temprano en el que se extiende la banda germinal, la franja de expresión de *Dfezf* se rompe en la línea media dorsal (Figura 40, C-D), generando dos dominios simétricos bilateralmente (Figura 40, D-E). Durante la embriogénesis tardía, las células que expresan *Dfezf* se delaminan y se agrupan para formar parte de los hemisferios cerebrales (Figura 40 C, F) (Irimia et al., 2010).



**Figura 40. Expresión de *Fezf* durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*.** (A-F) Expresión del gen *Fezf* de *Drosophila* (violeta) durante la embriogénesis, como previamente se ha descrito (Pfeiffer et al., 2008, Irimia et al., 2010) en embriones de estadios 4 (blastodermo sincitial), 5 (blastodermo celular), 8, 10, 11-12 y 14, respectivamente. La región anterior se encuentra hacia la izquierda (todas son vistas dorsales excepto en C que es dorsolateral). La cabeza de flecha en C indica la ruptura de la franja de expresión inicial. br: hemisferios cerebrales.

Con el objetivo de averiguar si la expresión relativa de los genes *lrx* y *Fezf* está conservada en *Drosophila* y así ver si ambos genes tienen una expresión relativa semejante a la que muestran en cordados, donde definen la ZLI. Para ello, embriones de la línea *mirr-Z* se hibridaron *in situ* con una sonda anti-*Dfezf* y se detectó la expresión de  $\beta$ -galactosidasa (para seguir la transcripción del gen *mirr*). El resultado se muestra en la Figura 41. La expresión de *Dfezf* es anterior (en

el protocerebro) y adyacente a la de *mirr* (en el deutocerebro). Ambos se encuentran dentro de la región de *otd*, como cabría esperar.



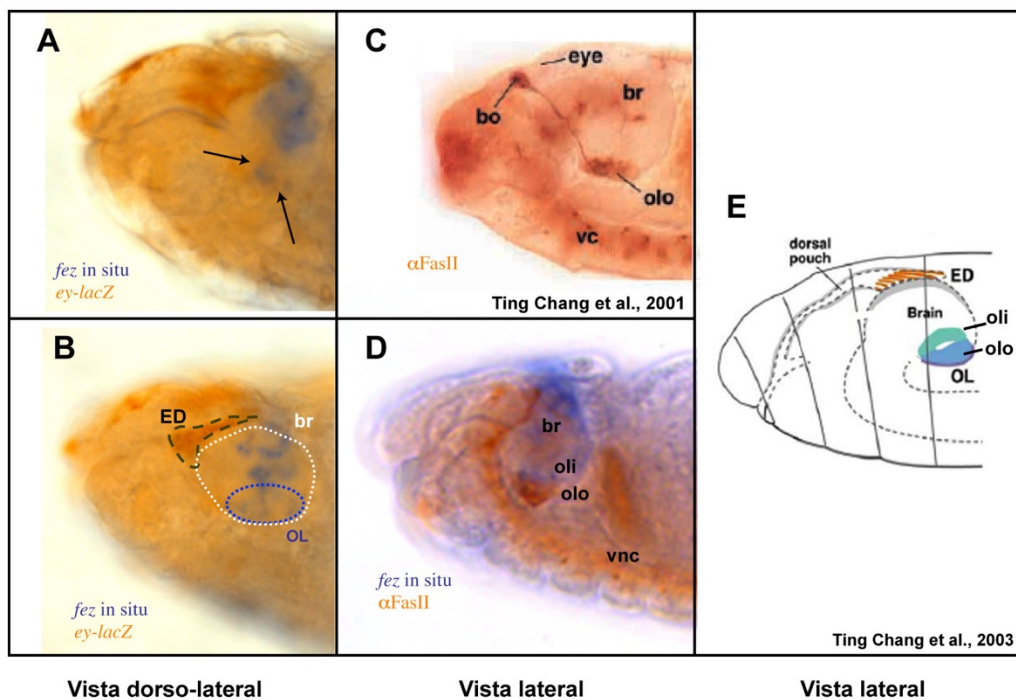
**Figura 41. *Dfezf* y *mirr* (del complejo *Ir*x) tienen patrones de expresión limitantes y excluyentes. (A) Presentación esquemática del SNC de *Drosophila* (protocerebro (P), deutocerebro (D), tritocerebro (T) corresponden en vertebrados con el prosencéfalo o lóbulo frontal, el mesencéfalo y el romboencéfalo, respectivamente) mostrando la expresión de *DFezf* (*earmuff/CG31670*), *Ir*x (*mirr*) y OTX (*otd*). *GBX* (*unpg*) se expresa más tarde limitando con *Otx* (Hirth et al., 2003). (B) Vista lateral de los patrones de expresión de *DFezf* (violeta) y *mirr* (naranja). La región anterior está a la izquierda. Ambas son vistas laterales.**

Nuestros resultados, junto al hecho de que en *Drosophila* los ortólogos de *Otx* y *Gbx* también muestran dominios de expresión complementarios (Hirth et al., 2003) y la presencia del hueco entre los dominios de expresión del gen *Fezf* de moscas y el ortólogo de *Gbx* (*unpg*), sugiere que este simple plan inicial de genoarquitectura, el cuál subdivide el sistema nervioso central de vertebrados, ya estaba presente en el último ancestro común de los animales bilaterales no extintos.

De forma significativa, *Fezf* e *Ir*x en vertebrados se regulan entre sí de una manera mutuamente excluyente. En mutantes "knockout" y "knockdown" para estos genes, en diferentes especies de vertebrados, hay un cambio en el límite de expresión del gen oponente, ya sea hacia la región anterior (en el caso de *Ir*x, Hirata et al., 2006 y Jeong J-Y et al., 2007) o hacia la región posterior (en el caso de *Fezf*, Rodríguez-Seguel et al., 2009). Para evaluar si esta situación estaba al menos parcialmente conservada en moscas, analizamos también la expresión de *Dfezf* en embriones mutantes *iro*<sup>DFM3</sup>, los cuales carecen de los tres genes *Ir*x de *Drosophila* (Gomez-Skarmeta et al., 1996). En fuerte contraste con lo que ocurre en vertebrados, no encontramos ningún cambio apreciable en el límite posterior de la expresión de *Dfezf*, ni ninguna expansión en su dominio de expresión (datos no mostrados) (Irimia et al., 2010).

## 2. *Fezf* en el sistema visual de *Drosophila*.

Viendo que la expresión de *Dfezf* durante la embriogénesis tardía en *Drosophila* queda restringida a los hemisferios cerebrales, en los cuales se encuentran los primordios de los globos ópticos (encargados de procesar la información del sistema visual), nos pareció de especial interés utilizar marcadores del sistema visual para precisar mejor el dominio de expresión de *Dfezf*.



**Figura 42. Expresión de *Dfezf* en el primordio del globo óptico.** (A-E) Imágenes de la región anterior del embrión de *Drosophila* donde se desarrollan los primordios del cerebro y del sistema visual. (A-B) Vistas dorso-laterales de embriones *ey-lacZ*, estadios 15-17. El gen reportero *lacZ* marca la región del primordio de ojo (en naranja y delimitado por una línea discontinua negra en B), bajo la cual se detecta la expresión de *Dfezf*, mediante hibridación in situ, (en púrpura) en la región del cerebro (línea punteada blanca en B) y en la región de los globos ópticos (flechas en A y línea punteada púrpura en B). (C) Vista lateral de un embrión en estadio 15 marcado con anti-FasII, el cual tiñe la región externa del primordio del globo óptico (olo), así como el bolwig (bo). (D) Vista lateral de un embrión de estadio 15-17 con una tinción con anti-FasII (naranja) que marca la posición del olo y la in situ de *Dfezf* (púrpura) que abarca tanto la región del cerebro, así como las regiones externa (olo) e interna (oli) del primordio del globo óptico. (E) Esquema modificado de la región anterior de un embrión de estadio 17, vista lateralmente, donde se representa la localización del primordio de ojo (ED), del cerebro, así como de las regiones externa (olo) e interna (oli) del primordio de globo óptico.

Para tal fin, utilizamos la línea reportera como *ey-lacZ*, ya que *eyeless* es uno de los marcadores más tempranos del primordio de ojo en el embrión y marca el primordio de disco de ojo de una forma clara (Halder et al., 1995).

Como se puede apreciar en la Figura 42, *Dfezf* se expresa en el embrión no sólo en la región que dará lugar a los hemisferios cerebrales de *Drosophila*, sino también en la región que formará los globos ópticos. Al comparar el patrón de *Dfezf* con los patrones de *ey* y de *FasII* (un marcador de axones que nos permite visualizar los primordios del órgano de bolwig (bo, el órgano visual larvario) y de los globos ópticos (ol), así como el nervio óptico que los une y otras regiones del sistema nervioso), podemos deducir que *Dfezf* no se expresa en los primordios de los discos imaginales de ojo (Figura 42B), ni en el bo (Figura 42D).

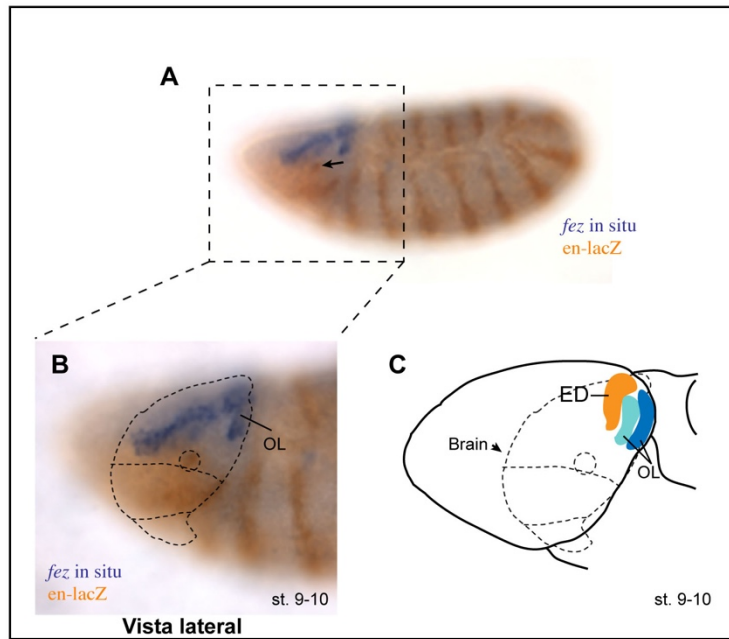
Una vez más con la ayuda de la línea reportera *en-Z*, encontramos que la expresión de *Dfezf*, en embriones de estadio 10, está restringida al protocerebro Figura 43 (C) y nos ayuda a delimitar la región anterior del embrión de manera que sea más evidente la identificación de cada dominio en el esquema representado en la misma Figura 43, confirmando la expresión de *Dfezf* en el primordio de los globos ópticos (ver Figura 43).

*engrailed* (*en*) es un gen que establece la polaridad de los segmentos en el embrión y tiene un punto de expresión denominado "*engrailed head spot*", detectable desde el estadio embrionario 9, que se localiza justo en el límite inferior del protocerebro, permitiendo localizar el límite entre el protocerebro y el deutocerebro (Schmidt-Ott and Technau, 1992). Por tanto, encontrar la expresión de *Dfezf* en la región anterior a el "*engrailed head spot*" nos ayuda a confirmar que *Dfezf* se expresa en el protocerebro.

Teniendo en cuenta nuestro especial interés en el sistema visual, decidimos estudiar el patrón de expresión de *Dfezf* en los globos ópticos, durante los estadios larvarios, para comprobar si la expresión en el embrión perdura durante los siguientes estadios.

Efectivamente, *Dfezf* se expresa en los globos ópticos de la larva de *Drosophila*, muy levemente en los estadios más tempranos, formando una línea que recorre toda la herradura del globo óptico, y siendo más evidente durante el tercer estadio, en el que no sólo se aprecia en la región externa del globo óptico (OPC), sino también en la región interna (IPC), concretamente en la lóbula. La expresión de *Dfezf* más intensa y consistente, es la que observamos en

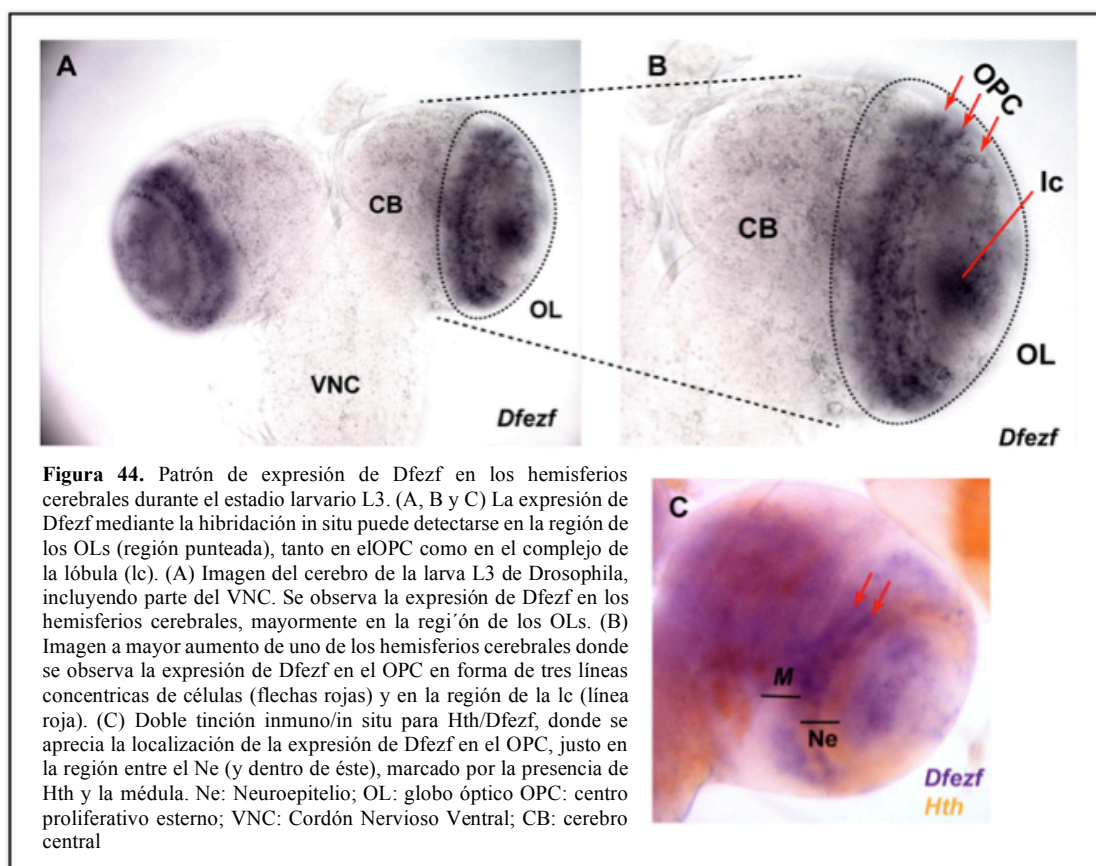




**Figura 43. Expresión de *Dfezf* relativa a *en*.** (A,B) Vista lateral de un embrión de estadio 9-10, en el que se aprecian la expresión de *Dfezf* (púrpura) con respecto a la expresión de *engrailed* (*en*) (naranja). (A) La flecha indica el punto de expresión de *engrailed* llamado "*en head spot*" compuesto por células del cerebro situadas en el límite inferior del protocerebro. (B) Vista lateral a mayor magnificación de la región anterior del embrión donde se aprecia el dominio de expresión de *Dfezf* que abarca la región del ectodermo prosencefálico (zona superior de la región punteada de negro) y que incluye la región que corresponde al primordio de los OL. (C) Esquema de la región anterior de un embrión en estadio 10, marcando la posición de los primordios del OL y del ED. (B, C) La línea punteada negra delimita la región del cerebro y sus subdivisiones (de arriba hacia abajo: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro), adaptación de un esquema de Younossi-Hartenstein (J. Comp. Neurol. 370, 1996).

la región externa del OL, donde se aprecian entre dos y tres filas de células paralelas que recorren la estructura en forma de herradura (Figura 44). También hay evidencias para pensar que además se expresa en regiones del cerebro (Weng et al., 2010), aunque en este trabajo no se especifica si el gen se expresa en los OLs. Aunque, Pfeiffer y colaboradores publicaron un trabajo en el que generaron varias líneas reporteras para reproducir el patrón de *Dfezf* tanto en embrión como en la larva (Pfeiffer et al., 2008), no consta una descripción del patrón original de *Dfezf* en los OLs ni en el cerebro. Para definir con más precisión el patrón de expresión de *Dfezf* en los OLs de L3, utilizamos varios marcadores en combinación con hibridación *in situ* con sondas para *Dfezf*. Estos marcadores fueron *dac* (que marca las LPCs y las neuronas de la lámina), *L'(1)sc* (que marca el avance de la ola de diferenciación de los NBs de la médula y por tanto el límite entre la región del Ne y la médula), *dpn* (marca los NBs de la médula) (datos no mostrados) y *hth* (marca el dominio de células proliferativas y multipotentes en el Ne del OPC, así como se expresa en las LPCs) (Figura 44C ). Estos experimentos nos permiten concluir que *Dfezf* se expresan el OPC en la región que limita con el neuroepitelio (Ne) hacia el lado lateral, donde se expresa *hth*, y por el lado medial limita con el dominio de expresión de *dpn*, donde los neuroblastos comienzan a dividirse activamente de forma asimétrica para dar lugar a las neuronas de la médula cortical. La expresión de *Dfezf*

abarca toda la herradura del OPC y se detecta en forma de 2-3 líneas paralelas de células que expresan *Dfezf*.



Después del análisis del patrón de expresión, intentamos un análisis de la función de *Dfezf* utilizando para ello la atenuación mediada por ARNi (líneas UAS-ARNi 7312R-2 y 7312R-3 de Nig-fly). No obstante, esta línea no producía la atenuación de la expresión (analizada mediante hibridación *in situ*). No existían otros mutantes *Dfezf*. Antes de que pudiésemos generar más reactivos Weng y colaboradores publicaron su trabajo sobre el gen *Dfezf/earmuff* (Weng et al., 2010).

Estos autores partieron de un cribado de mutantes que causaban tumores cerebrales. Uno de éstos, el mutante identificado como l(2)5138, resultó tener una mutación en el gen *Dfezf*, tras su mapeo. Estudiando este mutante, llegaron a la conclusión de que *Dfezf* restringe el potencial de los progenitores

intermedios neuronales (INPs) (que provienen de neuroblastos de tipo II) activando el gen *prospero* (*Prox1/pros*), limitando así su proliferación y

antagonizando con la vía Notch para prevenir la des-diferenciación (Ver Figura 45).

### DISCUSIÓN

Las homologías entre los patrones de expresión de los genes ortólogos utilizados como marcadores del SNC, tales como *otd/Otx*, *unpg/Gbx2*, *Pax2/5/8* y *Hox*, indican que *Drosophila* presenta un cerebro con estructura tripartita, al igual que los vertebrados y otros organismos bilaterales (Hirth et al., 2003; Reichert, 2005; Urbach et al., 2007). Los genes *otd/Otx* y *unpg/Gbx2*, cuya expresión es yuxtapuesta, delimitan la posición del Isthmus organizer (IsO), uno de los principales organizadores secundarios del cerebro, y también conocido como Midbrain-Hindbrain Boundary (MHB). La posición del IsO es ancestral a todos los organismos bilaterales (Castro et al., 2006; Hirth et al., 2003). Sin



embargo, se conocía mucho menos sobre el origen evolutivo de la zona *limitans intrathalamica* (ZLI).

A partir de nuestros resultados, podemos decir que la expresión relativa de los genes *Fezf* e *lrx* que delimitan la posición de la ZLI en vertebrados, está conservada en mosca y posiblemente en otros invertebrados protostomados, indicando que las subdivisiones genéticas que definen la localización de ambos organizadores secundarios durante el desarrollo temprano del cerebro de vertebrados estaban ya presentes, probablemente, en el ancestro común de los bilaterales. Sin embargo, en contraste con lo que ocurre en vertebrados, encontramos que la pérdida de función de los genes *lrx* en *Drosophila* no causa ninguna alteración en el patrón de expresión de *DFezf*. Por tanto, la represión de *Fezf* por los genes *lrx* no parece estar conservada en *Drosophila*. Sería interesante poder analizar si la represión de los genes *lrx* por parte del gen *Fezf* se mantiene. Para ello el único mutante *DFezf* del que se puede disponer sería el creado y utilizado por Mo Weng y colaboradores, el mutante I(2)5138 (Weng et al., 2010) ya que, al menos en nuestras manos, las líneas ARNI para *Dfezf* no resultaron efectivas.

## Capítulo 2: Primera parte: Resultados

A pesar de los trabajos publicados por Barret D. Pfeiffer y Mo Weng sobre *Dfezf* en *Drosophila*, ninguno de ellos presenta una descripción sobre el patrón de expresión endógeno del gen *Dfezf* durante el desarrollo embrionario, ni larvario. En esta tesis y en el trabajo de colaboración con M. Irimia (M. Irimia et al., 2010), realizamos una descripción detallada del patrón de transcripción de *Dfezf*, tanto durante el desarrollo embrionario, en el cual puede observarse un patrón muy dinámico, como en larva L3, concretamente en la región de los globos ópticos. Estas descripciones pueden ayudarnos a entender mejor la función de *Dfezf*. Así durante L3, *Dfezf* se expresa en una región donde comienza la diferenciación de los NBs de la médula siendo, por tanto, una región de transición. Esta información concuerda con la función que Weng y colaboradores atribuyen al gen *DFezf*. Esta función indica que *DFezf* es importante durante la diferenciación de los neuroblastos de tipo *poll* para restringir el potencial de los progenitores neuronales intermedios. En otras palabras, *Dfezf* permite la transición entre proliferación y diferenciación gracias a que contribuye establecer un estadio intermedio en el que los progenitores detienen

su proliferación, quedando establecido su destino y a la espera de órdenes para continuar con su proceso de diferenciación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Capítulo 2: Primera parte; M&M

---

#### Hibridación *in situ*, Inmunodetección y stocks utilizados.

La sonda para *Dfezf* fue preparada a partir del cADN correspondiente (GH14092), utilizando digoxigenina (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) como marcador. El cADN *Fezf* de *Drosophila* (GH14092) correspondiente al CG31670 fue obtenido de *Drosophila* Genome Resources. Los embriones de *Drosophila* se recolectaron en placas de agar con zumo de manzana y levadura (Nusslein-Volhard, 1977). El pretratamiento de los embriones, así como la hibridación *in situ* fueron realizados como se ha descrito previamente (Jekely et al., 2007), con algunas modificaciones: el tratamiento de proteinasa K fue obviado y las incubaciones con anti-DIG (1:1000) fueron realizados durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la doble *in situ* e inmuno, se utilizó el anticuerpo anti- $\beta$ galactosidasa de conejo (Cappel) y fue incubado junto al anti-DIG. Primero, se realizó la detección de  $\beta$ -galactosidasa como se ha descrito previamente (Dohrmann et al., 1990), después la señal de la hibridación *in situ* fue revelada, visualizando los productos de reacción de la fosfatasa alcalina con nitroblue tetrazolium chloride (NTB)-5-bromo-4-cloro-3'-indoly-phosphate p-toluidine salt (BCIP) en color púrpura. Los stocks de *Drosophila* utilizados fueron *mirr<sup>880-lacZ</sup>* y la deficiencia de *lrx*, *iro<sup>DFM3</sup>* (Gómez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997) y *hth-lacZ*. La deficiencia *iro<sup>DFM3</sup>* fue balanceada sobre un balanceador "azul" TM6B, P(35UZ) DB1, Tb<sup>1</sup> (Flybase: <http://flybase.org/>) y las líneas UAS-*Dfezf*-ARNi (7312R-2 y 7312R-3 del National Institut of Genetics, Japan (Nig-Fly)). Los embriones fueron simultáneamente hibridados con las sondas contra los transcritos *dFezf* y  $\beta$ galactosidasa. Se consideraron los embriones homocigóticos para *iro<sup>DFM3</sup>* aquellos que no transcribían para  $\beta$ galactosidasa. Los embriones fueron deshidratados y montados como se ha descrito previamente (Hartenstein et al., 1989). Las larvas utilizadas en cada experimento fueron crecidas a 25°C y los cerebros fueron disecados y fijados de acuerdo con los protocolos estandar. La hibridación *in*

*situ* en las larvas se llevó acabo de forma similar que en los embriones, con la excepción de que la temperatura de hibridación fue 5°C más alta. La *in situ*/inmuno de las larvas *hth-lacZ*, se realizó por el mismo procedimiento que para los embriones salvo la temperatura de hibridación para la *in situ*, que fue de nuevo 5°C más alta.

## SEGUNDA PARTE

### Estudio del gen *Fezf2* en el desarrollo de la retina en vertebrados.

#### INTRODUCCION

En el apartado anterior se describe la familia génica *Fezf*, la primera vez que se clonó uno de sus miembros, sus dominios conservados, etc. Así mismo, se describe una de las funciones más estudiadas de *Fezf* y más ampliamente conservadas, la que hace referencia a su papel en el establecimiento del eje anteroposterior (A-P) durante el desarrollo del cerebro. Sin embargo, se han descrito funciones adicionales para los genes de esta familia en estadios posteriores del desarrollo. Por ejemplo, más tarde durante el desarrollo, *Fezf2* es importante para el desarrollo de ciertas neuronas del cerebro rostral en ratón (Chen et al., 2005a; Chen et al., 2005b; Hirata et al., 2004; Komuta et al., 2007; Molyneaux, 2005) y para el desarrollo de neuronas DA, tipo-Oxitocina, GABAérgicas y serotoninérgicas en pez cebra (Blechman et al., 2007; Guo et al., 1999, Jeong et al., 2006; Levkowitz, 2003; Yang et al., 2012).

Watanabe y colaboradores, también relacionan el gen *Fezf1* con el sistema olfatorio de ratones (Watanabe et al., 2009). *Fezf1* se expresa también en el epitelio olfatorio. Normalmente las neuronas receptoras olfatorias (ONRs) proyectan sus axones desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio, sin embargo, en ratones deficientes para *Fezf1*, los axones de las ONRs no alcanzan el bulbo olfatorio porque son incapaces de penetrar a través de la lámina basal del SNC.

Por otra parte, son varias las interacciones que se conocen para los genes *Fezf*: *Fezf1* y *Fezf2* reprimen directamente la expresión de *Hes5* en ratón. *Hes5* es un efector aguas abajo de la vía de señalización de Notch y previene la diferenciación neuronal reprimiendo el gen *Neurogenina2*. Por tanto, La expresión de ambos genes *Fezf* promueven la expresión, indirectamente, del gen de la *Neurogenina2*, promoviendo así la diferenciación neuronal (Shimizu and Hibi, 2009).

*Fezf2* es también necesario para activar los genes HD (homeodominio) *Orthopedia* (*Otpb*) y *Dlx2* (*Distal-less in Drosophila*) en distintas subpoblaciones de progenitores de la parte ventral del lóbulo frontal del cerebro en pez cebra (Yang et al., 2012). La proteína homeodominio *Otpb* es clave para el control de la especificación de neuronas hipotalámicas neuroendocrinas (Acampora et al., 1999; Wang and Lufkin, 2000). El gen *Otpb* se expresa en la región ventral del lóbulo frontal y es requerido para la especificación de las neuronas dopaminérgicas (DA) (Blechman et al., 2007; Ryu et al., 2007). Así mismo, *Otpb* regula la especificación de las neuronas isotocinérgicas (IT) en la misma región ventral del lóbulo frontal (Blechman et al., 2007). *Fezf2* es quien regula la expresión de *Otpb* en los dos centros hipotalámicos que producen neuronas IT y DA (Blechman et al., 2007). El otro gen HD que es activado por *Fezf2* es *Dlx2* (Yang et al., 2001; Yang et al., 2012), un gen que regula el desarrollo de neuronas GABAérgicas en mamíferos (Anderson et al., 1997) y que también se expresa en la región ventral del lóbulo frontal del cerebro. En mutantes *Fezf2*, la expresión de ambos genes, *Otpb* y *Dlx2* se ve afectada en las distintas subpoblaciones de progenitores en pez zebra (Yang et al., 2012).

La idea de explorar la expresión de *Fezf2* en retina de vertebrados fue motivada por una serie de evidencias: (1) Dadas las homologías en cuanto a las neuronas presentes en el globo óptico de *Drosophila* y las neuronas de las diferentes capas de la retina en vertebrados (descritas en el primer capítulo de esta tesis) y que *DFez* se expresa en los globos ópticos, cabía la posibilidad de encontrar expresión en la retina de vertebrados. (2) Buscando más información sobre los genes *Fezf* encontramos la expresión de *Fezf2* en retina de pez cebra en la base de datos ZFIN. (3) Dado que se trata de una familia génica altamente conservada, había evidencias de que *Fezf2* pudiera expresarse, además de en pez cebra, en la retina de otros organismos vertebrados como el pollo o el ratón (Blackshaw et al., 2004). (4) Conociendo la función de *DFez* durante la diferenciación de neuroblastos de tipo II, su papel induciendo la expresión del gen *prospero* (*Prox1* en vertebrados) y, que *Prox1* se expresa en retina de vertebrados en desarrollo, especulamos que *Fezf2* podría tener un papel similar

durante la diferenciación neuronal en la retina de vertebrados. Como primer paso para responder a esta pregunta, llevamos a cabo un estudio de expresión de los genes *Fezf* en la retina en desarrollo de pollo y ratón.

## RESULTADOS

### 1. Estructura proteica del gen *Fezf* y comparativa a nivel de proteína entre diferentes especies.

Mientras que en *Drosophila* hay un único gen *Fezf* (*earmuff* o *Dfezf*), anteriormente mencionado como *earmuff* o *Dfezf*, en vertebrados se trata de una familia génica de dos miembros, *Fezf1* y *Fezf2*. Como ya ha sido mencionado anteriormente, se trata de una familia génica muy conservada a lo largo de la evolución. A continuación, se muestra el alineamiento para ambas proteínas *Fezf1* y *Fezf2* en diferentes especies de vertebrados, entre ellas 3 especies de mamíferos; *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, una especie de anfibios, en la que ya fuera descrito el gen por primera vez (*Xenopus laevis*), "Zebrafish" como modelo establecido de teleosteo (*Danio rerio*), y como representante de aves y modelo de estudio de desarrollo de ojo, el pollo común, *Gallus gallus*.

A continuación, se muestran los alineamientos de las secuencias de los genes *Fezf1* y *Fezf2* para diferentes especies: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens*, *Danio rerio* y *Gallus gallus* (Figura 46 y Figura 47). Para ambos genes, *Fezf1* y *Fezf2*, se observa un alto grado de conservación para los dominios zinc-finger (verde) en todas las especies al igual que para el dominio represor Eh1 (rojo). En amarillo están marcadas las regiones homólogas que no pertenecen a un dominio proteico específico o no está conservado en las 6 especies. Los cladogramas para ambos parálogos están de acuerdo con las relaciones filogenéticas establecidas para las especies analizadas.



```

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment      Fezf2 protein sequence

gi:118097034      QVPARRRAMASSGSLETVMSPCPRHDGRAAAANPSKSLAFSIERIMAKTSEPKAAFEQR
gi:157822213      -----MASSASLETMVPPACPRAGAS---PATSKTLAFSIERIMAKTSEPRAPFEPR
gi:256355082      -----MASSASLETMVPPACPRAGAS---PATSKTLAFSIERIMAKTSEPRAPFEPR
gi:157388917      -----MASSASLETMVPPACPRAGAS---PATSKTLAFSIERIMAKTSEPRAPFEPR
gi:148226100      -----MSAPLETVM-SPCQRLDARTGAAAPPKSLAFSIERIMAKTSEPRAGVFEA
gi:18858667      MLTPSWVEMASSLPLETVM--SCPRLLDDRSRGATAAPKSLAFSIDRIMSKTSEPKAAAAEE
                        *   ***:   *   *   *:*****:***:*****:

gi:118097034      HGGPGPEPEAGKKPLSLCSPLCVPIPIPLGYEVPSKTLNLYSELWKSGLRG-----
gi:157822213      PAALEADSSQSKKLLNLCSPLCMIPLQPLGYEVPSKTLNLYSEFWKSSLRAGGGGG---
gi:256355082      PAALEADSSQSKKLLNLCSPLCMIPLQPLGYEVPSKTLNLYSEFWKSSLRAGGGGG---
gi:157388917      PGALEADGSQSKKLLNLCSPLCMIPLQPLGYEVPSKTLNLYSELWKSSLRAGGGGGGGG
gi:148226100      NQGL---ESGAKKTLNVCPPVPCMIPIQSLAYDVSPKALLNLYSELWRRSSIRG-----
gi:18858667      -----RSEGKKTVGLCSPIPCMIPIQPFPSYDLQAKALMNYSEFWKVNFRG-----
                        .  .** : : * :***: : : : : * :*.***: : : * :

gi:118097034      -----AGGLCKANCGVCCKAELALG---QPSGRLIKQVVIHQAGAVPAAPRS
gi:157822213      --GGSGGGGAPVCGASGLCKTNCGVCCKAELGLAPSALPAGRVIKPQVINQAVGLPAS--GS
gi:256355082      --GGSGGGGAPVCGASGLCKTNCGVCCKAELGLAPSALPAGRVIKPQVINQAVGLPAS--GS
gi:157388917      GGGGGGGGAPVCGASGLCKTNCGVCCKAELGLAPSALPAGRVIKPQVINQAVGLPAS--GS
gi:148226100      -----SLCGPSALCKSNCGICCKNDFNLSQSLAPSGRVIKPQVINQTLGMPSS--GS
gi:18858667      -----ALCTSAAMCKTNCGVCSKADAGIKHSVLPGTRVIKQVVIHQALAMPAN--GS
                        . : ** :***:*. * : : * . * :*****.* : : : *

gi:118097034      LYYFNYLDA-AYHPADLLHCGQLFPAGLLGPPPPGGLSAHQKLFLENAKLAGLAAEKLP
gi:157822213      LYYFNYLDSTTYPPESELLGGHLFPSGLLNAQAPTSAAHPKLFLENAKLASLTADKFP
gi:256355082      LYYFNYLDSTAYPPESELLGGHLFPSGLLNAQAPTSAAHPKLFLENAKLASLAADKFP
gi:157388917      LYYFNYLDSTAYPPESELLSGHLFPSGLLNAQAPALAHPKLFLENAKLAGLAADKFP
gi:148226100      FYYFNYLES-SFHPPDLLNQQLSSSLINAQSQATLSAHHKLFLLDNSKLSALAADKFP
gi:18858667      LCYFNYLDS-AYQS-ELLSGHLFSSAIANSQAQ-AISAHQKLFLENAKLACVSPEKFPT
                        : *****: : : : ** * : : : : : : : ** ** :***: : : : *

gi:118097034      PPPFAHKERLPGHLDQVMKEAAAAE-RGCPPKGHAKLGGGGGGTAEKGPKNFTCEVCGKV
gi:157822213      PASYPHKERLHAPLEQVLKENSALTAERGGVKSHSKLP---GGSTDSPKPNFTCEVCGKV
gi:256355082      PASYPHKERLHAPLEQVLKENSALTAERGGVKSHSKLP---GGSTDSPKPNFTCEVCGKV
gi:157388917      PAPYPHKERLPAPLEQVLKENSALTAERGGVKSHSKLP---GGSDGPKPNFTCEVCGKV
gi:148226100      P-QFPHKERLPGQLDQVMKENSALTDR-TGK-IHTKLS---ANSSEGPKPIFTCEVCGKV
gi:18858667      P-QYPHKEHLPGLDQIVRESHNLTEN-GVKAHSTN---NCSSDGPKPNFTCEVCGKV
                        * : ***: * . * :***: * . * : * : : : * : * : : .*** *****

gi:118097034      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
gi:157822213      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
gi:256355082      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
gi:157388917      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
gi:148226100      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
gi:18858667      FNAHYNLTRHMPVHTGARPFVCKVCGKGFQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRS
                        *****

gi:118097034      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCTICNKAHFQIYNLT
gi:157822213      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCTICNKAHFQVYNLT
gi:256355082      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCTICNKAHFQVYNLT
gi:157388917      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCTICNKAHFQVYNLT
gi:148226100      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCSICNKAHFQVYNLT
gi:18858667      STLNTHIRIHAGYKPFVCEFCGKGFHQKGNYNHKLTHSGEKQYKCSICNKAHFQIYNLT
                        *****:*. * :***:***

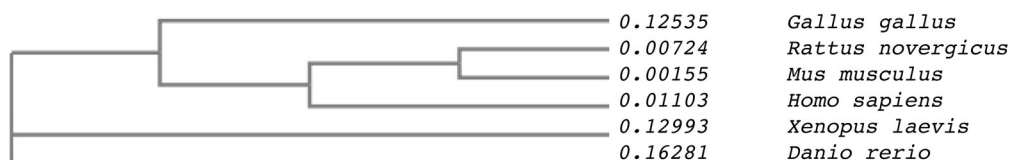
gi:118097034      FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFGRNFDLKKHVRKLHDSVSSAPPPPPRDPTRSGQS
gi:157822213      FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFGRNFDLKKHVRKLHDSVGPTATPSAKGLARTVQS
gi:256355082      FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFGRNFDLKKHVRKLHDSVGPTATPSAKDLARTVQS
gi:157388917      FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFGRNFDLKKHVRKLHDSVGPA--PSAKDLTRTVQS
gi:148226100      FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFGRNFDLKKHVRKLHDSVSSC--SHKEISRGTQS
gi:18858667      FHMHTHNDKKPFTCGTCGKGFGRNFDLKKHIRKLHDSNANCL--GGNDSSRGHQN
                        ***** *****:*****:*****. . . : * *.

```



<i>Gallus gallus</i>	>gi		118097034		ref		XP_414411.2	
<i>Rattus norvegicus</i>	>gi		157822213		ref		NP_001100721.1	
<i>Mus musculus</i>	>gi		256355082		ref		NP_536681.2	
<i>Homo sapiens</i>	>gi		157388917		ref		NP_060478.3	
<i>Xenopus laevis</i>	>gi		148226100		ref		NP_001089933.1	
<i>Danio rerio</i>	>gi		18858667		ref		NP_571711.1	

### Cladograma *Fezf2*



**Figura 45. Alineamiento de la secuencia proteica de *Fezf2* de diferentes especies.** Alineamiento de la secuencia proteica de *Fezf2* en 6 especies diferentes. Como se indica sobre esta leyenda, son: *Mus musculus* (gi:25635082), *Rattus norvegicus* (gi: 157822213), *Homo Sapiens* (gi: 157388917), *Danio rerio* (gi: 18858667), *Xenopus laevis* (gi: 148226100) y *Gallus gallus* (gi: 118097034). Los dominios zing-finger (verde) se encuentran altamente conservados, así como, el dominio represor Eh1 (rojo). En amarillo se resaltan las regiones o aminoácidos homólogos entre las diferentes especies, no pertenecientes a ningún dominio proteico específico. La secuencias más dispares son las pertenecientes a *Danio rerio*, seguida de la de *Xenopus laevis* y *Gallus gallus*, como puede deducirse de las distancias calculadas para el cladograma. En éste cladograma, las distancias de las ramas no representan tiempo.

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

**Fezf1 protein sequence**

```

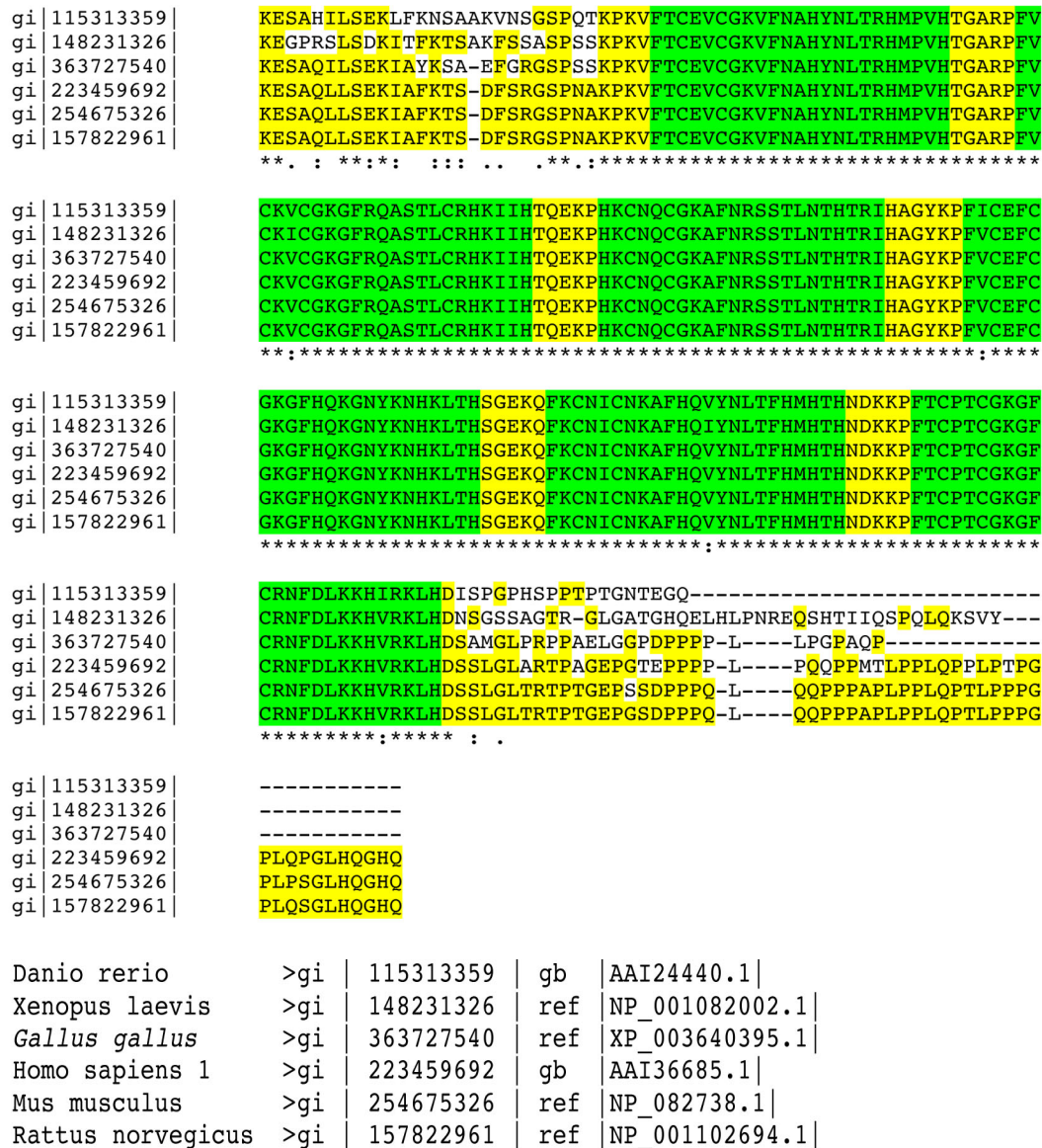
gi|115313359| MDSALYHSAGIF----GAPSASTGGSMIASSKPLAFSIERIMARTPEFKSIPFFNLFQA
gi|148231326| MDSSLQHSTTKILSTQESREALSNRLTMSGAKPLAFSIERIMSRTPFKCLPVASLLQS
gi|363727540| MDNSGHHTATKILAAPPARESLSARSTMIGTPKPLAFSIERIMARTPEFRSVPVPQLLHG
gi|223459692| MDSSCHNATTKMLATAP-----RGNMSTSKPLAFSIERIMARTPEFKALPVPHFLQG
gi|254675326| MDSSCLNATTKMLATAP-----RGNVMSTSKPLAFSIERIMARTPEFKALPVPHFLQG
gi|157822961| MDSSCLNATTKMLATAP-----RGNVMSTSKPLAFSIERIMARTPEFKALPVPHFLQG
          **.: .:. : . .:. *****:*****:.*. :.:.

gi|115313359| PVGKAEPKQS----PAPLHCMIPLMPLACEPPHKLHINGLDH-----PDTF
gi|148231326| SAPKGDQKPGLHINSSSIPRMIPFVPVAYEHCAKIGISGAELRKSH-----VDSSP
gi|363727540| SAAKGDAKHPLHLGS-SIPCMIPFVPVAYDPLGK--AAGAEPRKAPL-----DSSSP
gi|223459692| ALPKGEPKHSLHLNS-SIPCMIPFVPVAYDTSPKAGVTGSEPRKASLEAPAAPAAVPSAP
gi|254675326| AVPKGDPKHSLHLNS-SIPCMIPFVPVAYDTNSKAGVNGSEPRKASLEVPAPPAVAPSAP
gi|157822961| AVPKGDPKHSLHLNS-SIPCMIPFVPVAYDTNSKAGVNGSEPRKASLEVPAPPAVAPSAP
          *: * : ***:***: * * :

gi|115313359| AYNANELLSIGLNYKNEQQDAAPIGQYKLFRPRVNVQSSFHAMGAAVCYLNCGEGACPP
gi|148231326| PFSCDDLNCALTLKGDFPREALPLQYKLVRPRVNVHSSFHAMGAAFCYFNRGDSEWH
gi|363727540| SFSCGDLLNCALSLKGDFRDALPLQYKLVRPRVNVHSSFHAMGALCYFNRGDGPCH
gi|223459692| AFSCDDLNCALSLKGDLARDALPLQYKLVRPRVNVHSSFHAMGALCYLNRGDGPCH
gi|254675326| AFSCDDLNCALSLKGDLARDALPLQYKLVRPRVNVHSSFHAMGALCYLNRGDGPCH
gi|157822961| AFSCDDLNCALSLKGDLARDALPLQYKLVRPRVNVHSSFHAMGALCYLNRGDGPCH
          :.. :**.*. * : * : ****.*****:*****. :**.*. *

gi|115313359| HAGLVNLHPMASYLLNTPLHARQSLFSSEKSKQ-GAVADRCPPGVSFKELSHSLLHHYM
gi|148231326| PAS-INIHPMASYFLGSPLHQAPKCYVAERNKLLAPSVEKFPSGVTFKDLSQAQFQHYM
gi|363727540| ASG-VNIHPVASYFLSSPLQPQPKAYLA-ERNKLVPPADKFPAGVAFKDLSQAQLQHYM
gi|223459692| AAG-VNIHPVASYFLSSPLHPQPKTYLA-ERNKLVPAVEKYPSGVAFKDLSQAQLQHYM
gi|254675326| AAS-VNIHPVASYFLSSPLHPQPKTYLA-ERNKLVPAVEKLPSGVAFKDLSQAQLQHYM
gi|157822961| AAG-VNIHPVASYFLSSPLHPQPKTYLA-ERNKLVPAVEKLPSGVAFKDLSQAQLHNYM
          :. :*:***:***: * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```



### Cladograma *Fezf1*



**Figura 46. Alineamiento de la secuencia proteica de Fezf1 de diferentes especies.** Alineamiento de la secuencia proteica de Fezf1 en 6 especies diferentes. Como se indica sobre esta leyenda, son: *Danio rerio* (gi:115313359), *Xenopus laevis* (gi: 148231326), *Gallus gallus* (gi: 363727540), *Homo Sapiens* (gi: 223459692), *Mus musculus* (gi: 254675326) y *Rattus norvegicus* (gi: 157822961). Los dominios zing-finger (verde) se encuentran altamente conservados, así como, el dominio represor Eh1 (rojo). En amarillo se resaltan las regiones o aminoácidos homólogos entre las diferentes especies, no pertenecientes a ningún dominio protéico específico. La secuencias más dispares son las pertenecientes a *Danio rerio*, seguida de la de *Xenopus laevis* y *Gallus gallus*, como puede deducirse de las distancias calculadas para el cladograma. En éste cladograma, las distancias de las ramas no representan tiempo.

## 2. Expresión de *Fezf2* en distintos modelos de desarrollo de retina en vertebrados.

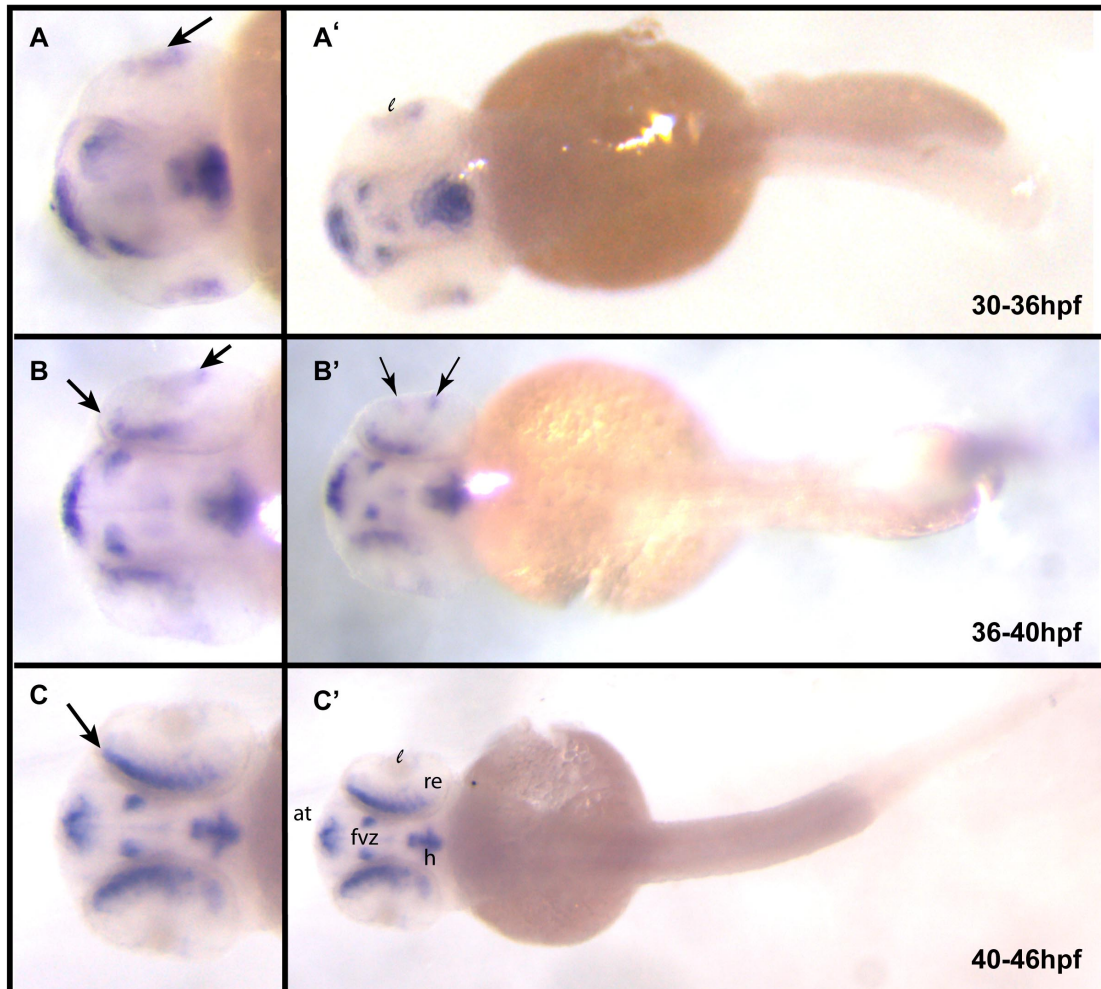
La retina es una ventajosa parte del sistema nervioso central (SNC) de vertebrados para analizar procesos como la neurogénesis (para revisiones, ver Cepko et al., 1996; Graw, 1996; Fini et al., 1997; Oliver and Gruss, 1997). Dado que la familia génica de *Fezf* está altamente conservada entre los vertebrados y puesto que se había detectado expresión de *Fezf2* en la retina de pez cebra (Thisse, C., and Thisse, B, 2005; leer más abajo), decidimos hacer análisis de expresión del gen *Fezf2* en otros vertebrados como el pollo y el ratón, tras previa clonación del gen, para preguntar si el patrón de expresión de *Fezf2* en la retina de pez cebra es una característica conservada de vertebrados.

### 2.1 Expresión de *Fezf2* en pez cebra (*Danio rerio*).

A pesar de todos los estudios publicados sobre el estudio de la familia génica de *Fezf*, poco se conoce sobre su posible papel durante el desarrollo del sistema visual, a excepción del trabajo publicado por Chunsheng Qu y colaboradores en retina de ratón (Qu et al., 2016). Por ello, decidí analizar la expresión de los genes *fezf* en la retina de pez cebra, un modelo al que teníamos acceso. La expresión de *Fezf2* en la retina de pez cebra ha sido previamente documentada por Thisse (Thisse, C., and Thisse, B, 2005) y registrada en la base de datos de ZFIN (<http://zfin.org>) para el estadio de 30-36 y 42-48 hpf (Figura 50). Sin embargo, para una mejor interpretación del patrón de expresión de *Fezf2* durante la especificación y diferenciación de la retina de ZF realizamos la hibridación *in situ* para *Fezf2* en estadios consecutivos desde 30 hasta 46hpf. Al mismo tiempo queríamos testar la sonda para realizar la hibridación *in situ* (HIS) de *Fezf2* con diferentes marcadores de retina para un análisis más exhaustivo de su patrón de expresión (La HIS con marcadores no llegó a realizarse por falta de tiempo) Utilizando hibridación *in situ* con sondas de ARN, encontré que *Fezf2*, y no *Fezf1*, se expresa en la retina de ZF. En la figura, se puede observar como *Fezf2* se expresa en la retina embrionaria de ZF, sonda e *in situ* que llevé a cabo siguiendo el protocolo de Thisse (Thisse, C., and Thisse, B, 2005).



Como se puede observar en la Figura 48, la expresión de *Fezf2* aparece en la lente a las 30-36 hpf, y justo poco después comienza a detectarse su expresión en la retina, en los dominios anterior y dorsal, y dentro de éstos, la expresión queda restringida a la capa más externa de la retina (36-40hpf). Posteriormente, el dominio de expresión se ve engrosado y se va extendiendo hacia la región posterior (40-46hpf), siguiendo la dirección en la que se produce la diferenciación de la retina, desde el extremo nasal anterior, hacia la región

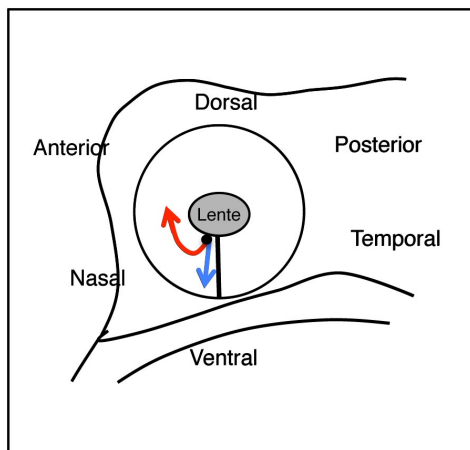


**Figura 47. Expresión de *Fezf2* durante diferentes estadios embrionarios de ZF.** (A'-C') Imágenes obtenidas mediante ISH mostrando el patrón de expresión de *Fezf2* de embriones de *Pez cebra* a diferentes estadios embrionarios. (A-C) vistas a mayor magnificación de la región de la cabeza de cada una de las imágenes de la derecha. (A) Embrión de 30-36 hpf mostrando la expresión de *Fezf2*. Además de la expresión detectada en diferentes zonas del cerebro (ae, fvz and h) nótese la expresión que aparece en la región de la lente (flecha). (B) Embrión de 36-40 hpf en el que se aprecia la expresión de *Fezf2* no sólo en la lente, sino también en la región de la retina que corresponde a la capa más externa de la misma, donde tiene lugar la diferenciación de los fotorreceptores, pero el dominio de expresión sólo abarca esta capa en sus regiones anterior y dorsal (flecha). (B') Cuesta identificar si la expresión está restringida a la lente o forma parte de las CMZs (flechas). (C) Embrión de 40-46 hpf. El dominio de *Fezf2* en la retina se extiende desde la región anterior hasta la región posterior de la retina, además de que su expresión en la capa más externa se ve engrosada (flecha). at: región anterior del telencéfalo; fvz: zona ventricular del cerebro rostral; h: hipotálamo; re: retina; ℓ: lente.

dorsal y terminando en la región temporal. En la Figura 50 (Thisse et al., 2005), se puede apreciar la expresión de *Fezf2* en un estadio algo posterior (48hpf), en el

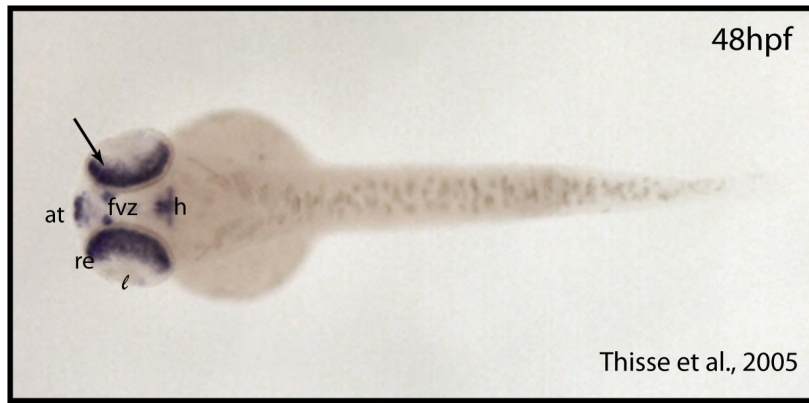
cuál se aprecia un engrosamiento del dominio de *Fezf2* que corresponde con un crecimiento en grosor de la retina (en cuya capa más externa se encuentran los fotorreceptores), así como la elongación del mismo llegando casi a la región nasal, en su extremo anterior, y hacia la región temporal en su extremo posterior. De este modo, pareciera que la expresión de *Fezf2* sigue un patrón espacio-temporal que concuerda con la onda de diferenciación de la retina, aunque no sabemos si está en fase o es algo anterior a la diferenciación de la retina. Se necesitarían otros marcadores de diferenciación junto a la ISH de *Fezf2* (doble *in situ*/inmuno), preferentemente sobre secciones de la retina, para averiguarlo.

Teniendo en cuenta que el proceso de diferenciación de la retina en ZF comienza en la región ventral-anterior y va avanzado como una ola de diferenciación hacia la región posterior-temporal, en dirección a las agujas de un reloj (Zheng Li et al., 2000), y que hacia las 48hpf comienzan a diferenciarse los primeros fotorreceptores, se podría decir que *Fezf2* se expresa en pez cebra, tanto en la lente del ojo, como en las células precursoras de los fotorreceptores y en los precursores de las neuronas ganglionares, en su proceso de diferenciación.



**Figura 48. Vista lateral de una retina de Pez cebra.** La ola neurogénica de diferenciación comienza en la región interna ventral-nasal de la retina (punto negro) y luego se propaga tanto hacia la superficie exterior (flecha azul), como hacia la región posterior-temporal de la retina en el sentido de las agujas del reloj (flecha roja). José Bessa (Tesis, Introducción general). Dibujo modificado del original.

Para extender la descripción del patrón de expresión de *Fezf2* en retina de vertebrados, realizamos un estudio de su expresión de *Fezf2* en otros dos modelos de vertebrados, como son el ratón (*Mus musculus*) y el pollo común (*Gallus gallus*).

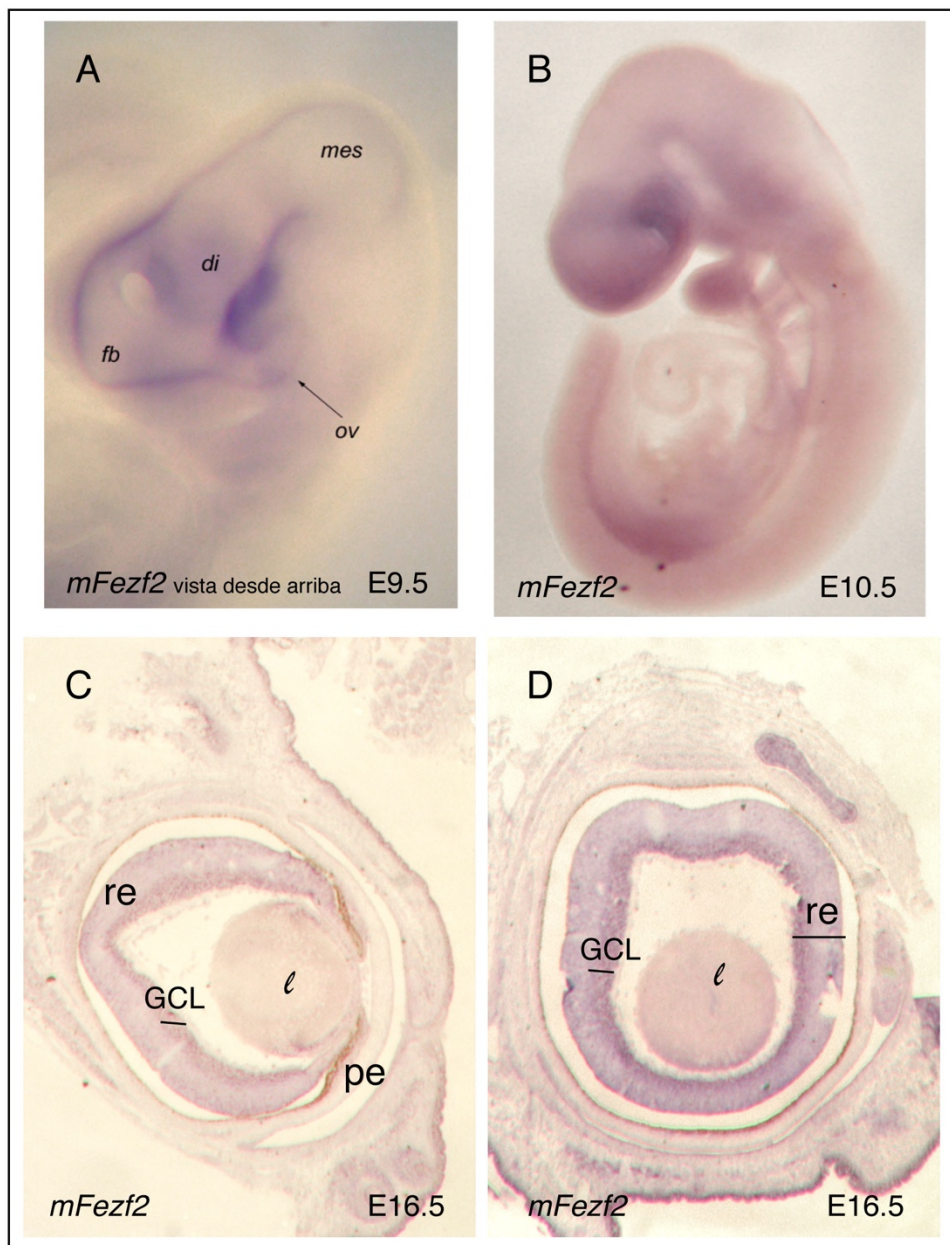


**Figura 49. Expresión de Fezf2 en la retina de ZF, imagen de Thisse (Thisse et al., 2005).** En esta imagen se observa una fuerte expresión de Fezf2 a las 48hpf, tanto en regiones del cerebro como en la retina (flecha). Nótese que el dominio de expresión de la retina alcanza desde la región anterior-nasal hasta casi toda la región temporal. La señal abarca no sólo la capa externa de la retina, sino que se extiende hacia la capa interior. at: región anterior del telencéfalo; fvz: zona ventricular del cerebro rostral; h: hipotálamo; re: retina; l: lente.

### 3. Caracterización de la expresión de *Fezf2* en ratón.

#### 3.1. Expresión de *mFezf2* en retina.

Para elegir los estadios en los que realizar la ISH, recurrí a la base de datos de "serial analysis of gene expression" SAGE, creada y publicada por Blackshaw y colaboradores (Blackshaw et al., 2004), en la que se recoge la expresión, en retina de ratón, de 1051 genes en diferentes estadios de desarrollo. En esta base de datos se muestra que *mFezf2*, también llamado Zfp312 (zinc finger protein 312), se expresa en el estadio E16 y E18, pero no en E12. Esto concuerda con los resultados de ISH de *mFezf2* en secciones de la retina de embriones en estadio E16.5 (Figura 51C y D), en la que se observa su expresión en la capa más externa, correspondiente a la futura capa de células ganglionares, es decir, que se podría decir que *mFezf2* se expresa en los precursores de las células ganglionares. También se observa expresión en la lente. A falta de más información sobre estadios más tempranos, realizamos la hibridación *in situ* de *mFezf2* en embriones completos E9.5 y E10.5, en los que puede observarse una débil expresión en la vesícula óptica (ov) (Figura 51A y B). De acuerdo con lo que ya se conoce sobre la función de *mFezf2* en el desarrollo del cerebro de ratón, encontramos expresión del gen en el cerebro frontal (fb), como cabría esperar (Figura 51A).



**Figura 50. Expresión de *mFezf2* en la vesícula óptica y en la retina de ratón durante el desarrollo embrionario.** (A, B) Se muestra la expresión del gen *mFezf2* en embriones de ratón en estadios E9.5 y E10.5, donde puede apreciarse una débil, pero evidente expresión del gen en la vesícula óptica. (A) Se aprecia la expresión de *mFezf2* en las regiones del cerebro frontal y el diencefalo. (C, D) Se muestra la expresión de *mFezf2* en la retina de embrión en estadio E16.5, C es una sección horizontal y D una sección sagital. Se observa una leve expresión en la lente y una marcada expresión en la región precursora de las células ganglionares. C corresponde a una sección longitudinal, mientras que la imagen D pertenece a una sección frontal de la retina.

### 3.2. Expresión de *mFezf2* en cerebro adulto.

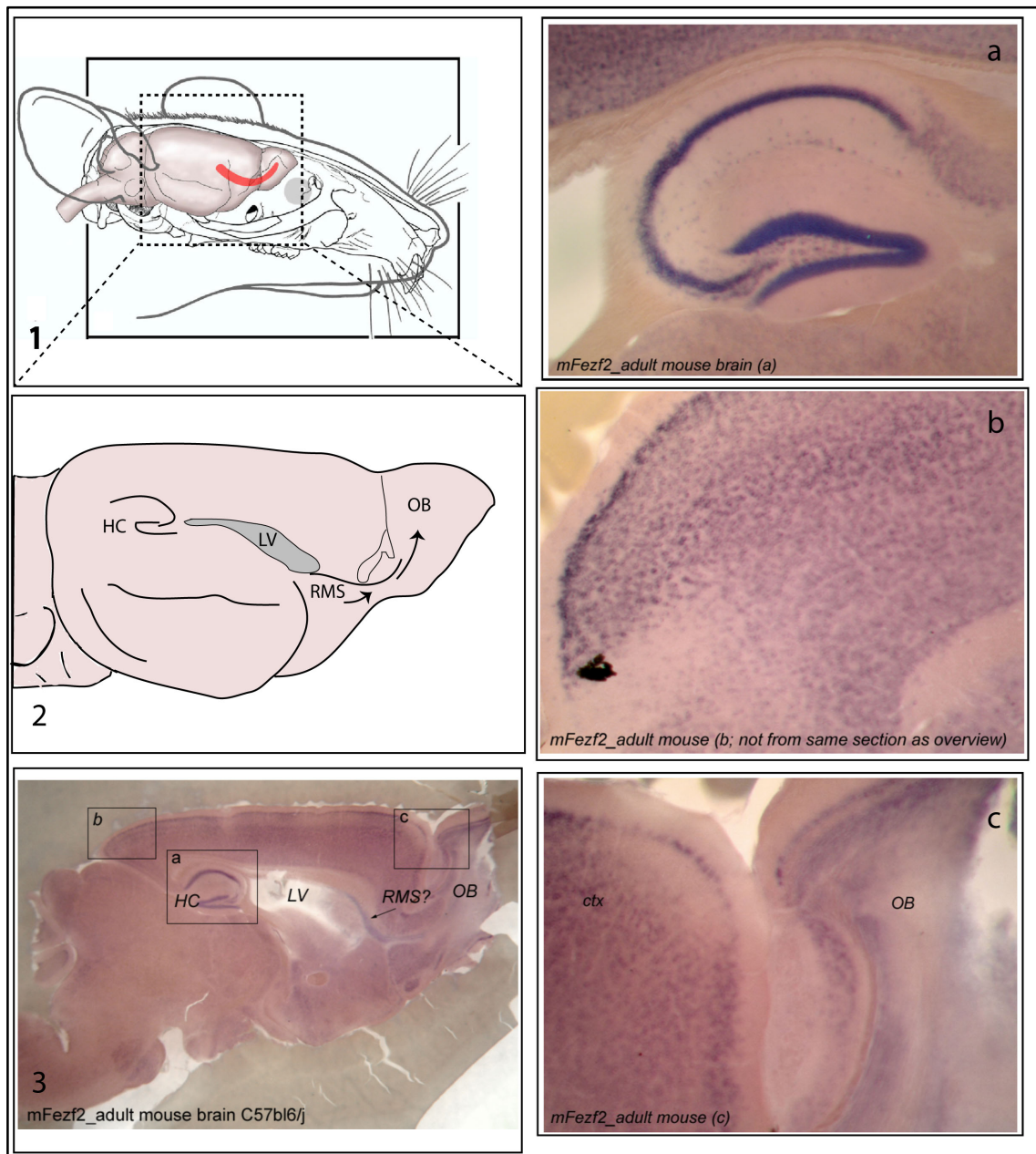
Como complemento al estudio de *mFezf2* en retina, y haciendo uso de la misma sonda, se realizaron ISH en secciones de la región frontal de cerebro adulto de ratón. Como puede observarse en la Figura 52, *mFezf2* se expresa en el cerebro adulto de ratón, dentro del cortex (ctx) (Figura 52b), así como en el



bulbo olfatorio (OB) (Figura 52c), y presenta un patrón de expresión muy bien definido en el hipocampo (HC), donde se encuentra la zona subgranular, una de las regiones proliferativas del cerebro adulto (Figura 52a). Según la base de datos de expresión genica en cerebro de ratón del *Allen Institut for Brain Science*, *Fezf2* también se expresa en el cortex cerebral, así como en el giro dentado del HC en el estadio E18.5 (<http://developingmouse.brain-map.org/experiment/show/100032175>).

De especial interés es la expresión de *mFezf2* en la región del giro dentado dentro de la formación hipocampal (Figura 52a), así como en la corriente migratoria rostral (RMS) (Figura 52, panel izdo. 3). Que se sepa hasta la fecha, el cerebro adulto sólo mantiene dos discretas regiones capaces de generar neuronas "de novo". Una de ellas es la zona subventricular (SVZ), la cuál delinea las paredes de los ventriculos laterales. Los neuroblastos ahí producidos migran de la SVZ hacia el bulbo olfatorio a través de una región llamada corriente migratoria rostral. La otra región donde se produce neurogénesis en el cerebro adulto es en la capa subgranular (SGL) del giro dentado del hipocampo. Las neuronas aquí producidas sólomente migran a corta distancia para diferenciarse en células granulares del hipocampo (para más información, ver la revisión de Lenington et al., 2003). La SGL cumple, por tanto, un papel muy importante en la memoria espacio-temporal. Sería muy interesante conocer la función de *mFezf2* en estas regiones proliferativas y en las regiones colindantes como pueda ser la RMS. Hasta ahora se ha visto que *Fezf2* se expresa en los progenitores de la zona ventricular (VZ) donde controla la especificación de las proyecciones neuronales subcerebrales. En ausencia de *Fezf2* la población neuronal no se especifica durante el desarrollo. (Chen et al., 2005; Molyneaux et al., 2005).





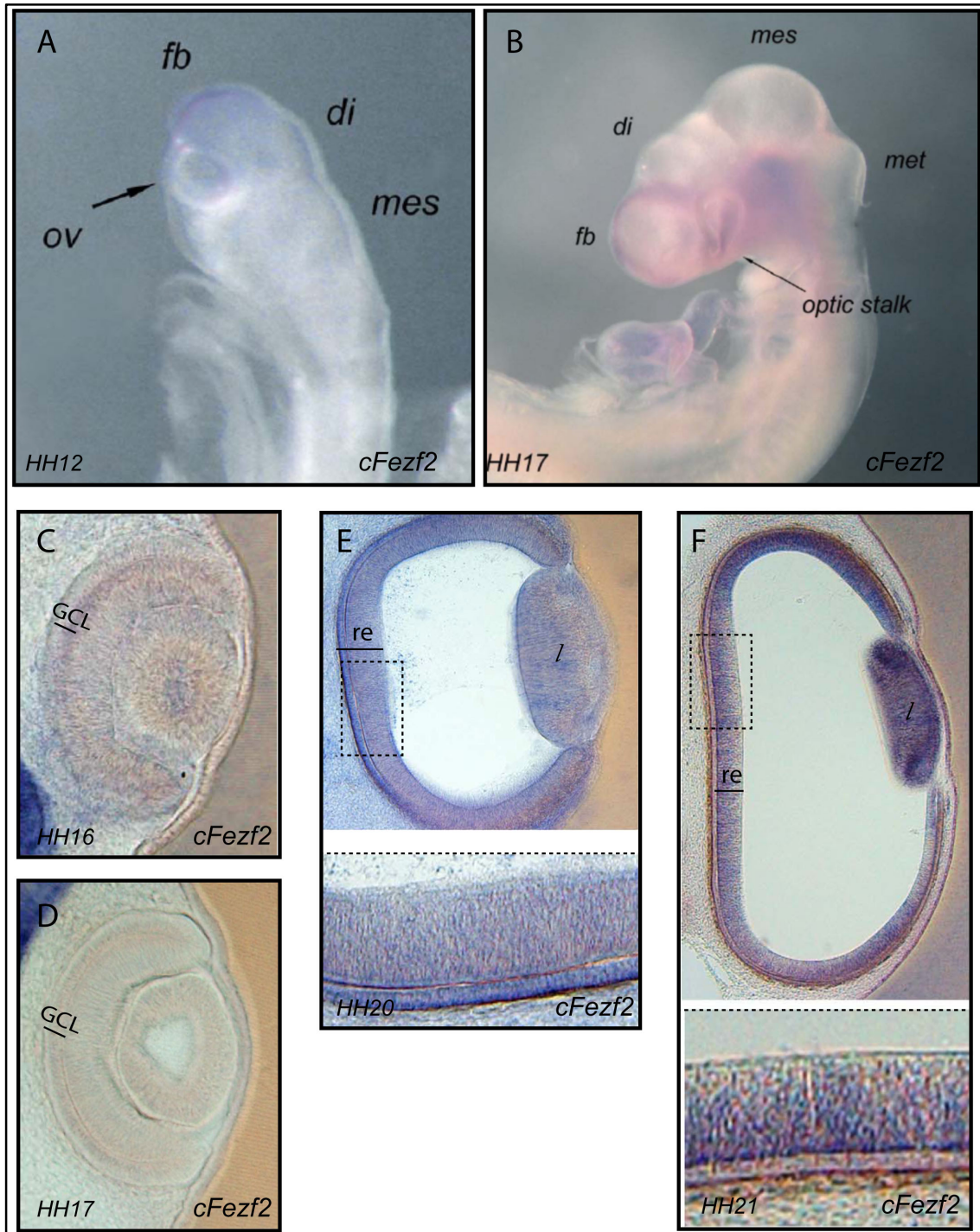
**Figura 51. Expresión de *mFezf2* en cerebro adulto de ratón.** (1) Esquema de la cabeza de ratón mostrando la localización del cerebro y su orientación. Las líneas discontinuas marcan la región que abarca la sección mostrada en el panel 3. (2) Esquema de la región frontal del cerebro adulto de ratón donde se esquematiza la localización del hipocampo (HC), así como del ventrículo lateral y la corriente rostral migratoria (RMS) que va hacia el bulbo olfatorio (OB) (3) Se muestra la expresión del gen *mFezf2* en una sección sagital del cerebro adulto de ratón. (a-c) Paneles de la derecha muestran por separado y a mayor magnificación las secciones marcadas en el panel 3 de la izquierda. (a) Expresión de *mFezf2* en el hipocampo (HC) donde se observa una marcada y bien definida expresión. (b) Expresión de *mFezf2* en el cortex cerebral. (c) Expresión de *mFezf2* en el bulbo olfatorio (OB) y parte del cortex cerebral (ctx). LV: ventrículo lateral; RMS: corriente migratoria rostral.

### 4. Caracterización de la expresión de *Fezf2*\* en embrión de pollo.

En pollo, la expresión de *cFezf2*\* (\* ver aclaración al final de esta sección) comienza a detectarse en el estadio HH12, donde aparece en el cerebro rostral y algo más débil en la vesícula óptica (Figura 53A). Este estadio corresponde, aproximadamente, al estadio E9.5 en ratón. Algo más tarde, en el estadio HH17, la expresión de *cFezf2*\* se hace más evidente en el cerebro rostral y en la vesícula óptica, siendo más fuerte su expresión en el tallo óptico (optic stalk) (Figura 53B).

En estadios posteriores durante el desarrollo embrionario, la expresión de *cFezf2*\* se hace más evidente en la retina. En la Figura 53C-D, puede apreciarse la expresión de *cFezf2*\*, aunque a bajos niveles, en la capa de células ganglionares. Posteriormente, en estadios HH20-21, la expresión es más fuerte y abarca la lente y prácticamente toda la retina, haciendo más difícil identificar en qué capa/s o células de la retina se expresa *cFezf2*\* (Figura 53E-F).

Para simplificar, se mantuvo el nombre *cFezf2* para el gen *cFezf* de *Gallus gallus*, pese a que el análisis de la secuencia nos reveló que es más similar a *Fezf1* en vertebrados y que no parece que haya ningún otro gen *Fezf* en esta especie que se exprese durante los estadios embrionarios (ver M&M).



**Figura 52. Expresión de *cFezf2* durante el desarrollo embrionario de pollo.** A-B WMISH para el gen *Fezf2* en embrión de pollo en estadios HH12 y HH17, respectivamente. C-F Secciones transversales de retina de pollo a distintos estadios mostrando la expresión de *Fezf2*. En los estadios HH16 y HH17 (C-D), la expresión es más evidente en la capa de células ganglionares (GCL), mientras que en estadios posteriores HH20 y HH21 (E-F) la expresión de *Fezf2* se expande de forma generalizada para abarcar prácticamente toda la retina. En este estadio se observa también expresión de *Fezf2* en la lente.



## DISCUSIÓN

En esta segunda parte, realizamos el análisis de la expresión gen *Fezf2*, como parte de la familia génica *Fezf*. Este gen (también conocido como *Fezf1*, 2NF312, 2fp312) es un factor de transcripción con dominios en dedos de zinc y descrito inicialmente por Matsuo-Takasaki y colaboradores (Matsuo-Takasaki et al., 2000) como específico del cerebro rostral. Es un gen altamente conservado evolutivamente, como hemos podido ver en las figuras Figura 46 y Figura 47. *Fezf2* se expresa en el desarrollo embrionario y está implicado en el modelado, así como en la neurogénesis tanto de pez cebra como de ratón.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta segunda parte, la familia génica *Fezf* está implicada en diversos procesos de neurogénesis, siendo muy importante para la diferenciación de diversos tipos neuronales. La mayor parte de estos hallazgos muestran una importante función para ambos genes en el desarrollo del sistema nervioso central, pero hasta la fecha de la realización de nuestros experimentos sobre el patrón de expresión de *Fezf2*, poco o nada se sabía sobre su implicación en el desarrollo de retina de vertebrados, salvo su expresión en retina de pez cebra gracias a Thisse y colaboradores (base de datos de ZFIN) que nosotros confirmamos y ampliamos para otros estadios embrionarios. El análisis de la expresión de *Fezf2* durante el desarrollo de la retina en otros modelos de vertebrado puede darnos una idea de cuán conservado puede estar este gen, no sólo a nivel del desarrollo de cerebro, sino de una forma más general en el desarrollo de tejidos neuroectodérmicos, como pueda ser la retina.

### 1. *Fezf2* durante el desarrollo de retina de vertebrados

En nuestros resultados de esta segunda parte, se muestra la expresión de *Fezf2* en diferentes estadios del desarrollo de retina en los tres organismos modelos más usados para el estudio del desarrollo de ojo, y de mayor representación en el grupo de organismos modelo de vertebrados, como son: *Danio rerio* (pez cebra), *Mus musculus* (ratón) y *Gallus gallus* (pollo común). En todos ellos encontramos un patrón de expresión dinámico y evidente durante el desarrollo



de la retina, así como también encontramos expresión en la lente del ojo (Figura 51D, Figura 53E-F).

Recientemente ha sido publicado un estudio en ratón, el cual confirma nuestros datos de expresión de *mFezf2* en la retina, afirmando que su expresión se ve confinada a la capa interna de las células progenitoras de la retina, así como a la futura capa de células ganglionares durante el estadio E16.5 (Qu et al., 2016). Aunque en consonancia con nuestros resultados, en la Figura 51 puede observarse una expresión de *mFezf2* más fuerte en la futura GCL comparado con la *ISH* mostrada por Chunsheng y colaboradores. Esto puede deberse a que se trate de una retina en un estado ligeramente más avanzado de diferenciación, o a un revelado más prolongado durante el proceso de la *in situ*. Chunsheng y colaboradores encontraron que *Fezf2* activa la expresión del gen *Brn3b*, un marcador de las células comprometidas para diferenciarse en células ganglionares de la retina (RGCs). *Fezf2* se une a la región reguladora 5' del gen *Brn3b*, regulando así su transcripción. Así, la falta del gen *Fezf2* en ratones knock-outs lleva a la inhibición del gen *Brn3b* y consecuentemente a una alteración en la formación de las RGCs.

Por otro lado, ya hemos comentado anteriormente que Weng y colaboradores (Weng et al., 2010) describieron la función de *DFezf* durante la diferenciación de neuroblastos de tipo II, donde *DFezf* induce la expresión de *prospero* (*Prox1*) haciendo que las células salgan del ciclo celular y se preparen para la diferenciación, así como inhibiendo la vía Notch para evitar la dediferenciación de los precursores de neuroblastos de tipo II durante su diferenciación. Tenemos pues, que *DFezf* es esencial para controlar el estadio intermedio durante la diferenciación de este tipo de células neuronales. Sería muy interesante estudiar el efecto de *Fezf2* sobre *Prox1* y la vía Notch durante la diferenciación de la retina de vertebrados y ver si esta función está conservada, pues parece obvio que *Fezf2* tiene algún papel durante la diferenciación de algunos tipos celulares de la retina, como es el caso, p. ej. de las RGCs.

Existen algunas evidencias que podrían indicar que *Fezf2* también podría antagonizar con la vía Notch durante el desarrollo de retina de vertebrados, como lo hace durante la diferenciación de neuroblastos de tipo II en *Drosophila*, pues ya ha sido descrito por Shimizu y colaboradores (Shimizu et al., 2010) que

*Fezf2* inhibe a *Hes5*, un gen diana de la vía Notch y represor del gen de diferenciación neuronal *Neurogenina2*. De este modo, *Fezf2* activa indirectamente el gen de la *Neurogenina2* promoviendo la diferenciación de las NSCs en neuronas o en progenitores intermediarios en el telencéfalo dorsal. Aunque el mecanismo por el cual *DFezf* reprime la vía Notch en *Drosophila* aún no ha sido revelado, los genes de la familia *Fezf* parecen regular negativamente la vía Notch tanto en vertebrados como en invertebrados. Sin embargo, en cerebro de ratón *Fezf2* es activador de *hes4.1*, otro gen diana de la vía Notch, que en este caso activa la vía Notch (Berberoglu et al., 2014). Esto podría resultar contradictorio, pero el efecto sobre las NSCs y su diferenciación sería el mismo, puesto que mientras que la vía Notch promueve la proliferación durante el cerebro en desarrollo (Gaiano and Fishell, 2002; Mizutani et al., 2007; Dong et al., 2012) (el caso de *Hes5*, donde *Fezf2* antagoniza con la vía para permitir la diferenciación), en el cerebro adulto la vía Notch actúa manteniendo las NSCs en un estado de quiescencia (Carlén et al., 2009; Chapouton et al., 2010; Imayoshi et al., 2010). Además, se sabe que diferentes receptores de la vía Notch, como *notch3* o *notch1b*, pueden causar diferentes respuestas celulares (Alunni et al., 2013), así como diferentes niveles de la señalización de Notch (Ninov et al., 2012). En resumen, el efecto de *Fezf2* tanto en cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto, parece ser mantener la quiescencia de las NSCs cuando es requerido asegurando la correcta formación de los progenitores intermediarios y su correcta diferenciación. Resulta de extremo interés comprobar si este papel de *Fezf2* es extensible a la diferenciación de la retina de vertebrados.

### **2. *Fezf2* durante el desarrollo del cerebro en vertebrados.**

También estudiamos la expresión de *Fezf2* en cerebro de ratón adulto, encontrando interesantes resultados sobre su expresión (Figura 52). *mFezf2* se expresa en la región del giro dentado dentro de la formación hipocampal (Figura 52a), así como en la corriente rostral migratoria (RMS) (Figura 52, panel izdo. 3). En cuanto a la expresión de *mFezf2* en la región del giro dentado dentro de la formación hipocampal, nuestros resultados concuerdan con los datos publicados por Berberoglu y colaboradores en uno de sus últimos trabajos



(Berberoglu et al., 2014), donde encuentran expresión de *mFezf2* en la zona subgranular (SGL) del giro dentado de la formación hipocampal en cerebro de ratón P21. Usando una línea transgénica Tg(*fezf2*-GFP), encontraron que las células con mayor expresión de GFP son aquellas que co-expresan el marcador *Blbp*, presente en células de glía radial (radial cell-like cells). También encontraron que unos pocos progenitores intermediarios (usando *Prox1* y *Tbr2* como marcadores) expresaban *Fezf2*. Entre las poblaciones celulares *Ki67*<sup>+</sup> (proliferativas) y *Ki67*<sup>-</sup> (no proliferativas) la expresión de GFP fue más marcada en aquellas células *Ki67*<sup>-</sup>. Esto indica que *mFezf2* no se expresa en las células progenitoras de la SGL, sino más bien en los intermediarios en proceso de diferenciación. Además, datos provenientes del atlas de cerebro de ratón (Allen Brain Atlas) para la expresión del mRNA de *fezf2* (<http://developingmouse.brain-map.org/experiment/show/100022558>) apoyan que este gen se expresa en la SGL también en el estadio P28, confirmando así nuestros resultados en cerebro de ratón adulto.

En cuanto a la región de la corriente rostral migratoria, se trata de una región de transición, por donde las células precursoras provenientes de la región ZSV (la otra región proliferativa en el cerebro adulto), migran en su proceso de diferenciación hacia el bulbo olfatorio. *Fezf2* se expresa en esta RMS en la que, probablemente, encontraríamos precursores y neuronas en estado intermediario de diferenciación. *Fezf1* por otra parte, sabemos que se expresa en el epitelio del bulbo olfatorio, donde parece tener una función en la formación de las proyecciones de las ONRs hasta alcanzar el bulbo olfatorio (Watanabe et al., 2009). Por lo que hemos podido ver hasta ahora, si bien, *Fezf1* y *Fezf2* parecen cooperar e incluso ser redundantes durante el establecimiento de las subdivisiones del cerebro en vertebrados, parece que ambos han desarrollado diferentes patrones de expresión, así como diferentes funciones en diversos tejidos neuroectodérmicos, como parece ser el caso en las diferentes partes del cerebro, el bulbo olfatorio y el ojo.

Un hecho muy interesante publicado en 2014, es el hallazgo de otra función de *Fezf2*, en mantenimiento de las células madre neuronales (NSCs). En este trabajo establecen que este gen es esencial para mantener el balance entre la quiescencia, la auto-renovación y diferenciación (Berberoglu et al., 2014). En

este caso, el trabajo realizado por Berberoglu y colaboradores se centra en las células madre neuronales del telencéfalo dorsal (DTel) en pez cebra (ZF), una zona que presenta una composición similar a las regiones neurogénicas de mamíferos, la SVZ y la SGZ, tanto en la heterogeneidad como en el enriquecimiento de células en diferentes estadios de especificación y diferenciación (März et al., 2010; Lindsey et al., 2012). Resulta interesante que *Fezf2* se expresa en los progenitores de las células tipo glía radial del telencéfalo (RGLs), del mismo modo que lo hace en las regiones neurogénicas del cerebro adulto de ratón, es decir, en la SGZ y próximo a la SVZ. De forma análoga a lo que ocurre en *Drosophila* (Weng et al., 2010), encontraron que los mutantes de *Fezf2* (*two few*) presentan un incremento en la proliferación. Sin embargo, en este caso también hay un incremento en la neurogénesis adulta, con lo cual las células son de menor tamaño, resultando en un cerebro de menor tamaño.

*Fezf2* es crucial para mantener la quiescencia de las NSCs en ZF, pero además es necesario para la correcta maduración de las neuronas en esa región del DTel. Lo que Berberoglu y colaboradores encontraron es que *Fezf2* se expresa a altos niveles en las células quiescentes del DTel mientras que en la población de células proliferativas del DTel lo hace a muy bajos niveles, pero aún detectables. Paradójicamente, si bien en ratón ha sido descrito anteriormente que *Fezf2* reprime *Hes5* (Shimizu et al., 2010), un regulador negativo de la vía Notch, en ZF *Fezf2* es requerido para la activación de *her4.1* (ortólogo de *Hes5*) de una forma dependiente de concentración (Berberoglu et al., 2014). *her4.1* disminuye la expresión del ligando de Notch, de forma que activa menos Notch en las células vecinas.

Por otra parte, como ya hemos comentado, *Fezf2* puede actuar tanto como activador como represor, dependiendo del contexto (Shimizu and Hibi, 2009; Chen et al., 2011), pero no se sabe con certeza qué determina que *Fezf2* actúe como represor o activador según el caso, si es dependiente de dosis o de estadio del desarrollo, especie, etc. En resumen, *Fezf2* actúa como modulador y ayuda a establecer un gradiente de la vía Notch entre células NSCs vecinas, activando la vía en las células que permanecen quiescentes y disminuyendo la actividad de Notch en células vecinas que permanecen en un estado proliferativo. *Fezf2* ayuda a mantener de este modo la homeostasis y el equilibrio

entre la población de células quiescentes vs. proliferativas en el nicho neurogénico del DTel. En cuanto a su papel durante la maduración de las nuevas células de esta región, Barberoglu argumenta que *Fezf2* podría actuar en las células progenitoras, imprimiendo la expresión de genes que son necesarios para la diferenciación, puesto que en células en diferenciación no es posible detectar la presencia de *Fezf2*.

**CONCLUSIONES:** Considerando los datos de expresión de *Fezf2* en retina, además de los datos publicados sobre alguna de sus interacciones con genes específicos para la diferenciación de células de la retina en vertebrados, podría decirse que *Fezf2* se expresa en regiones donde las células se encuentran en un proceso intermedio durante su diferenciación, siendo *Fezf2* importante durante el proceso de diferenciación de algunos tipos neuronales de la retina, como puedan ser las RGCs. Si bien, sería deseable un estudio más detallado de la expresión de *Fezf2* en la retina de vertebrados a diferentes estadios del desarrollo, usando diversos marcadores para poder precisar mejor su patrón de expresión temporal, lo cual permitiría diseñar experimentos más concretos y dilucidar las interacciones entre *Fezf2* y las diferentes vías de señalización que operan durante el desarrollo de la retina. También resulta de especial interés la comparativa entre diferentes especies de vertebrados para ver cuán conservada está su función en la retina. Con nuestros resultados hemos mostrado por primera vez la expresión de *Fezf2* en la retina de pollo (*Gallus gallus*), aportando una prueba más de que la expresión de *Fezf2* en la retina parece estar conservada en vertebrados, pues encontramos su expresión tanto en mamíferos (*Mus musculus*), como en teleósteos (*Danio rerio*), así como en aves (*Gallus gallus*).

En el cerebro, también parece que *Fezf2* se expresa, bien en regiones proliferativas del cerebro adulto (nótese que sólo se conocen dos hasta la fecha), o en sus proximidades, siendo probable que *Fezf2* participe en uno de los estadios intermedios durante la diferenciación de las neuronas generadas de “novo” durante el estadio adulto, como puedan ser las neuronas del epitelio olfativo (cuya producción se sabe que es incrementada durante el ciclo estral y durante la lactancia en hembras).

Por otra parte, encontramos que *Fezf2* tiene una función esencial en el mantenimiento del estadio intermedio durante la diferenciación de los neuroblastos de tipo II en *Drosophila*, promoviendo a las células su salida del ciclo celular a través de la expresión de prospero (*Prox1*), así como asegura el no retroceso hacia un estado proliferativo al antagonizar con la vía Notch. En ZF, *Fezf2* también interactúa con la vía Notch para mantener el equilibrio entre la población de células proliferativas y células quiescentes en la región neurogénica del DTel. Así mismo, en ratón, *Fezf2* se expresa a altos niveles en las células quiescentes de la región neurogénica hipocampal del giro dentado (SGZ) en el cerebro adulto (Berberoglu et al., 2014), cabiendo la posibilidad de que la función observada para *Fezf2* en ZF, esté conservada también en mamíferos. Todo esto apunta a que *Fezf2* podría tener una función genérica en el mantenimiento del equilibrio de los nichos de células madre adultas en los tejidos neurogénicos, asegurando que la diferenciación ocurra de una manera correcta y previniendo la des-diferenciación y consecuente formación de tumores. De este modo podríamos aventurarnos a decir que *Fezf2* pudiera ser un gen supresor de tumores, pues los mutantes en homocigosis presentan un descontrol de la proliferación y al menos en *Drosophila* ha sido descrita la aparición de tumores cerebrales en ausencia de este gen (Weng et al., 2010).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Comparación de secuencias proteínicas para *Fezf2*.

Las secuencias proteicas de las diferentes especies estudiadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos de NCBI (la primera referencia es el numero GI que es el primer identificador de número de referencia usado anteriormente por la base de datos de GenBank. Actualmente, y desde 1999 se utiliza más el sistema VERSION, en nuestros datos corresponde a la segunda referencia, por ejemplo, XP\_414411.2). Para el "BLAST" de múltiples secuencias se utilizó Clustal Omega 1.2.2 (nueva versión de Clustal W2), un programa usado vía web (McWillman et al., 2013). Se utilizaron los parámetros dados por defecto. El cladograma o árbol filogenético se obtuvo con el mismo programa basándose en el cálculo de las distancias por el método *Neighbour-joining*.

### 2. Clonaje de *mFezf2* y producción de la sonda.

Para analizar el patrón de expresión de *Fezf2* en ratón, tanto en el primordio de ojo como en el cerebro, el primer paso fue crear una sonda para registrar la expresión de *Fezf2* mediante hibridación *in situ* (ISH). Este gen recibe multiples nombres y números de referencia, según la base de datos: NM\_080433; Mm.34644; MCG20371; Zfp312; ENSMUSG00000021743. Todas ellas hacen referencia a la misma secuencia del gen *Fezf2* en la que nos basamos para diseñar los cebadores para hacer la sonda. Los cebadores finales para crear la sonda fueron:

Nombre	Cebador	secuencia	Tm
mFezf2_1	Forward	CATGCCATGGCCAGCTCAGCTCCCTG	71°C
mFezf2_2_HA	Reverse	GGAATCCCCGCTCTGAAGTGTCTGGCTAG	70,9°C
mFezf2_probe	Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGGGTTGATGACCTGCGGTTG	68°C

El cebador reverso contiene parte de la secuencia del "tag" HA para poder clonarlo posteriormente en un vector que contiene 3 copias del "tag", ese vector es pSLAX-13 HA y estaba pensado para sobre-expresar *mFezf2* mediante electroporación de partículas víricas previamente transformadas después de

subclonar en el vector RCAS (esta parte del trabajo no se llegó a concluir durante la estancia. Se clonó la secuencia cADN completa del gen *Fezf2*, mediante RT-PCR a partir de ARN de ratón. Para la extracción de ARN de ratón se utilizó el método de Trizol (Invitrogen), previa homogeneización (con nitrógeno líquido y pasando la muestra varias veces por una jeringuilla) de un fragmento (100mg) de cerebro de ratón embrionario, donde tenemos constancia que se expresa *Fezf2*. Para la RT-PCR se utilizó el kit SuperScript™ One-step RT-PCR System (Invitrogen). Se siguieron las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción y la "master mix". Las muestras se corrieron en un gel para verificar el tamaño y se extrajo el ADN del gel para su clonaje y secuenciación. El fragmento de ADN se clonó en TOPO vector, usando TOPO TA cloning kit. Una vez comprobada su secuencia, se utilizó un tercer cebador inverso, mFef2\_probe, el cual lleva añadido el promotor de T7 para amplificar un fragmento de menor tamaño que puede ser directamente utilizado para la síntesis de la sonda de ARN con el enzima T7. Se sintetizó la sonda de ARN utilizando digoxigenina (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) como marcador. El tamaño de la sonda es de 460pb.

**Programa de RT-PCR utilizado:**

Paso	Temperatura	Tiempo	
1	47°C	pausa	
2	47°C	30min	
3	94°C	2min	
4	94°C	15sec	} 5 ciclos
5	58°C	30sec	
6	72°C	1min45sec	
7	94°C	15sec	} 35 ciclos
8	64°C	30sec	
9	72°C	1min45sec	
10	72°C	5min	
11	4°C	pausa	



**Nucleotide Sequence mFefz2 (1368 nt):**

ATGGCCAGCTCAGCTTCCCTGAGACCATGGTGCCCCGGCCTGCCCCGCGCGCTGGAGCGTCACCGGCCA  
 CTTCTAAAACACTAGCTTTCTCTATCGAGCGCATCATGGCCAAGACGTCCGAGCCCCGAGCGCCTTTCTGA  
 GCCCCGGCCTGCTGCGTTAGAGGCAGACAGCAGCCAGAGCAAGAAACTGCTCAACCTCTGCTCGCCGCTG  
 CCCTGTATGATCCCTCTCCAGCCTCTAGGCTACGAGGTGCCGTCCAAGACGCTGCTCAGTTACTCGGAGT  
 TCTGGAAGAGCAGCCTCCGGGCGGGCGGCGGTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGGGGGGCCCCAGTGTGCGG  
 CGCCAGCGGCTTGTGCAAAACCAACTGTGGCGTGTGCTGCAAGGCCGAACGGGCCCTCGCGCCTTCTGCG  
 CTGCCCCGCCGAGGGTCAATCAAACCGCAGGTCAATCAACCAGCTTCGGAGCTCCTCGGAGGCCACCTTTTCCC  
 TCTACTACTTCAACTACCTGGACTCCACCGCTTACCCACCTTCGGAGCTCCTCGGAGGCCACCTTTTCCC  
 ATCCGGCCTCCTCAACGCACAGGCCCCCACTTCCCTGGCTGCTCACCCCAAGCTTTTTCTGCTGGAGAAC  
 GCCAAACTGGCCAGCCTGGCTGCGGACAAGTTCCCCCACCAGCTTCCCTATCCCCATAAGGAGCGCTTGC  
 ATGCGCCACTGGAGCAGGTGCTGAAGGAGAACTCGGCCCTTGACAGCTGAACGAGGGGGAGTCAAGAGCCA  
 CAGCAAACTACCGGGGGGCTCTACTGACAGCAAAACCAAACTTCACCTGCGAAGTGTGCGGCAAGGTG  
 TTCAATGCTCACTATAACCTCACCCGCCACATGCCTGTCCACACCGGAGCTAGACCGTTTGTGTGCAAAG  
 TCTGTGGCAAAGGCTTCCGCCAGGCCAGCACTCTCTGCAGACACAAAATTATCCATACCCAGGAAAAACC  
 ACATAAGTGTAACCAAGTGCAGCAAAGCCTTCAATCGCAGCTCCACGCTCAACACGCACATCCGCATCCAC  
 GCGGGCTACAAGCCCTTCGTCTGCGAGTTTTGTGGCAAAGGCTTTCACCAAAAAGGGAACATAAGAATC  
 ACAAGCTCACCCACAGCGGCGAGAAGCAGTACAAATGCACTATCTGTAACAAGGCCTTCCATCAGGTCTA  
 CAATCTGACCTTCCACATGCACACCCACAACGACAAGAAGCCTTTCACGTGTGCCACTTGCGGCAAAGGT  
 TTTTGCAGAACTTTGACTTAAAGAAACATGTGCGCAAACCTTCATGACAGCGTGGGTCCCACCGCCACCC  
 CCTCAGCAAAGGACCTAGCCAGGACAGTTCAGAGCTGA

**3. Clonaje de *cFefz2* y producción de la sonda.**

Para el clonaje del gen *Fefz2* en pollo, el procedimiento fue un tanto más complicado, debido a la falta de una base de datos más contrastada y fiable. En un principio nos basamos en la secuencia del gen correspondiente para *Fefz2*, que según la base de datos de NCBI tiene como referencia XP\_414411.2. Otro de los problemas añadidos fue el alto contenido en GC en el genoma de pollo, que requiere altas temperaturas de alineamiento de los cebadores, por lo que al diseñarlos no se puede restringir mucho el porcentaje de GC, nosotros utilizamos hasta un 65% de tolerancia en contenido GC.

Se utilizaron distintos cebadores sin éxito, por lo que decidimos utilizar cebadores degenerados, que se suelen utilizar para extraer un gen nuevo cuando su secuencia proteica está muy conservada. Los cebadores degenerados se generan a partir de la secuencia proteica y tienen un número de opciones en varias posiciones en la secuencia para permitir el alineamiento y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas. Ese número de opciones viene dado por la tolerancia del tercer nucleótido de cada codón para un aminoácido dado. Diferentes especies tienen preferencia por una u otra base en esa posición (ver ejemplo del diseño de cebadores degenerados debajo).

Ejemplo de primer degenerado:

Protein sequence:	P	L	A	F	S	I	E	R	I
Nucleotide sequence:	ccu ccc cca cgg	uua uug cuu cuc cua cug	gcu gcc gca gcg	uuu uuc	ucu ucc uca ucg acu acg	auu auc aua	gaa gag	cgu cgc cga cgg aga agg	auu auc aua

Primer sequence: 5' ccc ctg gcc ttc tcc ath gar mgn at- 3'

Nomenclatura Universal (código IUPC) (Extraído de Eurofin\_genomics)

Y = pirimidinas = C / T	K = G / T	S = G / C
R = purinas = A / G	M = A / C	H = A / C / T
V = C / G / A	W = A / T	D = A / G / T
N = nucléotido = C / G / A / T	B = G / C / T	

En un principio, y para evitar amplificar otras secuencias de genes con dominios en *Zn finger*, se evitó utilizar los dominios de la secuencia correspondiente a los dedos de Zn. No hubo ningún resultado positivo tras la PCR y se recurrió al diseño de nuevos cebadores degenerados, poniendo el cebador izquierdo (forward) en uno de los bloques conservados al comienzo de la secuencia y el cebador derecho (reverse), directamente en uno de los bloques en dedo de Zn. Se diseñaron dos pares cebadores con el objetivo de hacer PCR anidada e ir refinando hasta conseguir aislar nuestra secuencia de interés del resto de secuencias con dedos de Zn, incluida la de *Fezf1*. Para el diseño de los cebadores degenerados agrupamos la secuencia proteica de *Fezf2* de varias especies en los bloques más conservados mediante "Block Maker" ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/make_blocks.html)) y luego utilizamos el programa CODEHOP (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) para diseñar los cebadores sobre los bloques más conservados.

Bloques obtenidos con "Block Maker"

```

BLOCKS from MOTIF

**BLOCKS from MOTIF**
>unknown__ fez family zinc finger protein 2 [Mus musculus] family
6 sequences are included in 11 blocks

unknown__A, width = 22
gi|148226100|ref|NP_23 APPKSLAFSIERIMAKTSEPPA
gi|157388917|ref|NP_23 ATSKTLAFSIERIMAKTSEPPA
gi|157822213|ref|NP_23 ATSKTLAFSIERIMAKTSEPPA
gi|18858667|ref|NP_32 AAPKSLAFSIDRIMSKTSEPKA
gi|256355082|ref|NP_23 ATSKTLAFSIERIMAKTSEPPA
gi|62858763|ref|NP_23 ATPKSLAFSIERIMAKTSEPKA

unknown__B, width = 35
gi|148226100|ref|NP_ ( 13) 58 KKTLLNVCPPVPCMIPIQSLAYDVSPKALLNYSELW
gi|157388917|ref|NP_ ( 16) 61 KKLNLCSPLPCMIPLQPLGYEVPSKTLTLLSYSELW
gi|157822213|ref|NP_ ( 16) 61 KKLNLCSPLPCMIPLQPLGYEVPSKTLTLLSYSEFW
gi|18858667|ref|NP_ ( 9) 63 KKTVGLCSPIPCMIPIQPFPSYDLQAKALMNYSEFW
gi|256355082|ref|NP_ ( 16) 61 KKLNLCSPLPCMIPLQPLGYEVPSKTLTLLSYSEFW
gi|62858763|ref|NP_ ( 13) 58 KKLNLCSPLPCMIPIQSLAYDVHSPKALLNYSELW

```

```

unknown_C, width = 29
gi|148226100|ref|NP_ ( 7) 100 LCGPSALCKSNCGICCKNDFNLSQSLAPS
gi|157388917|ref|NP_ (24) 120 VCGASGLCKTNCGVCCKAEGLAPSALPA
gi|157822213|ref|NP_ (19) 115 VCGASGLCKTNCGVCCKAEGLAPSALPA
gi|18858667|ref|NP_ ( 7) 105 LCTSAAMCKTNCGVCSKADAGIKHSVLPG
gi|256355082|ref|NP_ (19) 115 VCGASGLCKTNCGVCCKAEGLAPSALPA
gi|62858763|ref|NP_ ( 7) 100 VCSPSGLCKSNCGICCKNDLNMGHTVLPG

unknown_D, width = 29
gi|148226100|ref|NP_ ( 0) 129 GRVIKQVINQTLGMPSSGSFYFNYLES
gi|157388917|ref|NP_ ( 0) 149 GRVIKQVINQAVGLPASGSLYFNYLDS
gi|157822213|ref|NP_ ( 0) 144 GRVIKQVINQAVGLPASGSLYFNYLDS
gi|18858667|ref|NP_ ( 0) 134 TKVIKQVIHQALAMPANGSLCCFNYLDS
gi|256355082|ref|NP_ ( 0) 144 GRVIKQVINQAVGLPASGSLYFNYLDS
gi|62858763|ref|NP_ ( 0) 129 SRVIKQVINQTVGLPTNGSLYFNYLDS

unknown_E, width = 37
gi|148226100|ref|NP_ (14) 172 SSLINAQSQATLSAHHKLFLLDNSKLSALAADKFPNP
gi|157388917|ref|NP_ (15) 193 SGLLNAQAPAAALAAHPKLFLLENAKLAGLAADKFPHP
gi|157822213|ref|NP_ (15) 188 SGLLNAQAPTSLAAHPKLFLLENAKLASLTADKFPHP
gi|18858667|ref|NP_ (12) 175 SSAIANSQAQAI SAHQKLLLENAKLACVSPEKFPPTP
gi|256355082|ref|NP_ (15) 188 SGLLNAQAPTSLAAHPKLFLLENAKLASLAADKFPHP
gi|62858763|ref|NP_ (14) 172 SSLINAQSQATLSAQKLFLLENAKLSGLAPEKFPNP

unknown_F, width = 23
gi|148226100|ref|NP_ ( 1) 210 FPHKERLPGQLDQVMKENSALTD
gi|157388917|ref|NP_ ( 2) 232 YPHKERLPAPLEQVLKENSALTA
gi|157822213|ref|NP_ ( 2) 227 YPHKERLHAPLEQVLKENSALTA
gi|18858667|ref|NP_ ( 1) 213 YPHKEHLPGQLDQIVRENHNLTE
gi|256355082|ref|NP_ ( 2) 227 YPHKERLHAPLEQVLKENSALTA
gi|62858763|ref|NP_ ( 1) 210 YPHKERLPGQLDQVMKENSALSA

unknown_G, width = 21
gi|148226100|ref|NP_ (31) 264 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK
gi|157388917|ref|NP_ (33) 288 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK
gi|157822213|ref|NP_ (33) 283 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK
gi|18858667|ref|NP_ (32) 268 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK
gi|256355082|ref|NP_ (33) 283 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK
gi|62858763|ref|NP_ (32) 265 AHYNLTRHMPVHTGARPFVCK

unknown_H, width = 43
gi|148226100|ref|NP_ ( 0) 285 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH
gi|157388917|ref|NP_ ( 0) 309 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH
gi|157822213|ref|NP_ ( 0) 304 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH
gi|18858667|ref|NP_ ( 0) 289 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH
gi|256355082|ref|NP_ ( 0) 304 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH
gi|62858763|ref|NP_ ( 0) 286 VCGKGFRQASTLCRHKIIHTQEKPHKCNQCGKAFNRSSSTLNTH

unknown_I, width = 19
gi|148226100|ref|NP_ ( 0) 328 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF
gi|157388917|ref|NP_ ( 0) 352 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF
gi|157822213|ref|NP_ ( 0) 347 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF
gi|18858667|ref|NP_ ( 0) 332 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF
gi|256355082|ref|NP_ ( 0) 347 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF
gi|62858763|ref|NP_ ( 0) 329 IRIHAGYKPFVCEFCGKGF

unknown_J, width = 28
gi|148226100|ref|NP_ ( 0) 347 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCSICNKAF
gi|157388917|ref|NP_ ( 0) 371 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCTICNKAF
gi|157822213|ref|NP_ ( 0) 366 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCTICNKAF
gi|18858667|ref|NP_ ( 0) 351 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCSICSKAF
gi|256355082|ref|NP_ ( 0) 366 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCTICNKAF
gi|62858763|ref|NP_ ( 0) 348 HQKGNYKNHKLTHSGEKQYKCTICNKAF

unknown_K, width = 45
gi|148226100|ref|NP_ ( 0) 375 HQVYNLT FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFCRNFDLKKHVRKLHDNV
gi|157388917|ref|NP_ ( 0) 399 HQVYNLT FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFCRNFDLKKHVRKLHDSV
gi|157822213|ref|NP_ ( 0) 394 HQVYNLT FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFCRNFDLKKHVRKLHDSV
gi|18858667|ref|NP_ ( 0) 379 HQIYNLT FHMHTHNDKKPFTCGTCGKGFCRNFDLKKHIRKLHDNA
gi|256355082|ref|NP_ ( 0) 394 HQVYNLT FHMHTHNDKKPFTCATCGKGFCRNFDLKKHVRKLHDSV
gi|62858763|ref|NP_ ( 0) 376 HQIYNLT FHMHTHNDKKPFTCGTCGKGFCRNFDLKKHVRKLHDNV

```

Los bloques representan los dominios de la proteína más conservados entre las diferentes especies. Las secuencias resaltadas en amarillo corresponden a las regiones sobre las que se diseñaron los cebadores. Los bloques se usaron posteriormente para el diseño de los cebadores degenerados con CODEHOP. Debajo se muestran un par de ejemplos de los resultados obtenidos.

Resultados para el bloque A

Secuencia proteica del bloque A

A T P K T L A F S I E R I M A K T S E P R A  
TCCATCGAGCGGATCatgdsnaarac -3' Core: degen=48 len=11 Clamp: score=74, len=15 temp= 61.8  
CCTTCTCCATCGAGCGGathatgdsnaa -3' Core: degen=72 len=11 Clamp: score=71, len=17 temp= 62.6  
CCTGGCCTTCTCCATCganmgnathatg -3' Core: degen=96 len=12 Clamp: score=73, len=16 temp= 62.3  
CCTGGCCTTCTCCATCganmgnathat -3' Core: degen=96 len=11 Clamp: score=73, len=16 temp= 62.3  
GACCCTGGCCTTCTCCathganmgnat -3' Core: degen=96 len=11 Clamp: score=70, len=16 temp= 60.0  
CCCAAGACCCTGGCcttywsnathga -3' Core: degen=96 len=11 Clamp: score=73, len=15 temp= 61.0

Resultados para el bloque C

V C G P S G M C K T N C G V C C K N D L N M A H S V L P G  
GGCATGTGCAAGACCAACTgyggnrtntg -3' Core: degen=64 len=11 Clamp: score=78, len=18 temp= 62.7  
GGGCATGTGCAAGACCAaaytgyggnrt -3' Core: degen=32 len=11 Clamp: score=75, len=16 temp= 62.9  
CCTCCGGCATGTGCAAGwsnaaytgygg -3' Core: degen=64 len=11 Clamp: score=77, len=17 temp= 62.5  
CCTCCGGCATGTGCAarwsnaaytg -3' Core: degen=64 len=11 Clamp: score=74, len=14 temp= 61.5  
CCCCCGGCATGtgyaarwsnaa -3' Core: degen=64 len=11 Clamp: score=65, len=13 temp= 60.6

Sobre estos resultados se escogieron los cebadores degenerados:

Degenerate alphabet  
Block unknown\_A  
P K T L A F S I E  
oligo:5'-CCCAAGACCCTGGCcttywsnathga-3' (  
T L A F S I E R I  
oligo:5'-GACCCTGGCCTTCTCCathganmgnat-3'  
L A F S I E R I M  
oligo:5'-CCTGGCCTTCTCCATCganmgnathat-3'  
L A F S I E R I M  
oligo:5'-CCTGGCCTTCTCCATCganmgnathatg-3  
F S I E R I M A K  
oligo:5'-CCTTCTCCATCGAGCGGathatgdsnaa-3  
S I E R I M A K T  
oligo:5'-TCCATCGAGCGGATCatgdsnaarac-3' ( Fezf2\_deg\_A

Lista final de cebadores degenerados seleccionados

Nombre	Cebador	secuencia	Tm
cFezf2_deg_A	Forward	TCCATCGAGCGGATCATgdsnaarac (48)	65,3°C
cFezf2_deg_B	Forward	GTCCCCCACTGCCCTgyatgathcc (6)	61,4°C
cFezf2_deg4_C	Forward	CGGCATGTGCAAGACCAaaytgyggnrt (32)	68°C
cFezf2_deg5_K	Reverse	CTTATCGTTGTGGGTGtgcatrtgraa (4)	63,4°C
cFezf2_deg1_F_3	Reverse	GCTGGCCGGGCAGGykytcytrtg (32)	70,4°C

Nótese que los números entre paréntesis corresponden al grado de degeneración del cebador. Este número se calcula como sigue:  
Para cFezf2\_deg\_A hay 4 bases degeneradas: n (4 posibles bases); d (3); s (2); r (2), luego el grado de degeneración es  $4 \times 3 \times 2 \times 2 = 32$

Para clonar el fragmento de *cFzf2* y sintetizar la sonda, se realizó una RT-PCR en dos pasos, dada la complejidad de la secuencia. Para ello se realizó la síntesis de cADN con una transcriptasa inversa, utilizando como molde ARN de pollo. Para la extracción de ARN de pollo se utilizó de nuevo el método Trizol (Invitrogen), usando como materia prima el tubo neural y las vesículas ópticas o retina (según estadio) de varios embriones de pollo en diferentes estadios.

En la primera PCR se obtuvo una banda de 1080bp con los cebadores *cFzf2\_deg\_A* y *cFzf2\_deg5\_K*. En la siguiente PCR semi-anidada, usando como molde la primera PCR, se usaron los cebadores *cFzf2\_deg\_B* y *cFzf2\_deg5\_K* y se obtuvo un fragmento de 345bp sobre el que se sintetizó la sonda. Este fragmento se mandó a secuenciar para comprobar que corresponde a *cFzf2*. Para la RT se utilizó SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con el siguiente programa en el termociclador.

\* En el paso 1 se añadieron los siguientes reactivos: 1µg ARN, 1µL cebadores aleatorios, 1µL dNTPs (10mM) y agua DEPC hasta completar 12µL.

En el paso 5 se añadió: 4µL buffer 5x, 2µL DTT (0,1M) y 1µL Inhibidor ARNs.

En el paso 8 se añadió 1µL del enzima transcriptasa inversa.

#### Programa para la síntesis de cADN

Paso	Temperatura	Tiempo
1*	65°C	pausa
2	65°C	5min
3	0°C	2min
4	0°C	pausa
5*	42°C	pausa
6	42°C	2min
6	42°C	pausa
7	25°C	pausa
8*	25°C	10min
9	42°C	50min
10	70°C	15min
11	0°C	2min
12	0°C	pausa



El cADN generado se utilizó para la primera PCR. En la primera PCR se obtuvo una banda de 1080bp con los cebadores cFezf2\_deg\_A y cFezf2\_deg5\_K. En la siguiente PCR anidada, usando como molde la primera PCR, se usaron los cebadores cFezf2\_deg\_B y cFezf2\_deg5\_K 3 y se obtuvo un fragmento de 345bp sobre el que se sintetizó la sonda. Este fragmento se mandó a secuenciar para comprobar si la secuencia corresponde a cFezf2. Sorprendentemente, las secuencias una vez contrastadas usando BLASTn (NCBI) con un 98% de homología con la secuencia clonada pertenecen al gen *Fezf1* de *Gallus gallus*, seguidas por otras secuencias de *Fezf1* de otras especies de aves y con un 88% de homología con el gen *Fezf1* de *Homo sapiens*. Cuando se utiliza BLASTx (NCBI), que compara las secuencias de proteínas, encontramos un 98% de homología con el gen *Fezf1* de *Mus musculus*. Ninguna homología a nivel de proteína fue encontrada con respecto al gen *Fezf2* en ninguna de las más de 90 especies entre las que la secuencia clonada resultó tener un nivel de homología del 98%. Con estos resultados, suponemos que no hay un segundo gen *Fezf2* en pollo y la secuencia clonada pertenece a un único gen perteneciente a la familia *Fezf*. Este dato no es de extrañar, dado que otros genes de vertebrados como *Vax1* y *Vax2* tienen un único representante en *Gallus gallus*, cVax. Mientras *Vax1* en vertebrados se expresa en la región ventral y anterior al tubo neural y *Vax2* se expresa en la región ventral de la vesícula óptica y en la región ventral neural de la retina, cVax se expresa tanto en el tubo neural como en la retina.

**Programa de PCR utilizado:**

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	pausa
2	94°C	5min
4	94°C	30sec
5	54°C	1min
6	72°C	1min45sec
7	94°C	30sec
8	58°C	1min
9	72°C	1min45sec
10	72°C	5min
11	4°C	pausa

Con el fragmento de ADN amplificado se sintetizó la sonda de ARN utilizando digoxigenina (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) como marcador y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Secuencia clonada para cFzf

```
GCTTGGTACGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGCTCCCCACTGC
CCTGTATGATCCCCCTTCGTGCCGGTGGCGTACGACCCCTGGGCAAAGCGGCGGGCGCGTAGCCCAGGAA
GGCGCCCTTGGACTCCTCTTCCTCGCCCTCCTTCAGCTGCGGCGATCTCTTGAACGTGCGCCCTGAGCCTG
AAAGGAGATTTCCCCCGCGACGCCCTGCCCTTGCCAGCAGTACAAACTGGTAAGACCCGAGTGGTCAATC
ACTCCTCCTTCCACGCCATGGGAGCCCTGTGCTATTTCAACCGAGGCGACGGCCCTGTACCCGGCCTC
CGGTGTCAACATCCACCCGGTGGCTTCTTATTTCTCAGCTCCCCGCTGCAGCCGAGCCCAAGGCGTAC
CTGGCGGAGCGGAACAAGCTGGTGCTGCCGCCCGCCGACAAGTTCCCGCCGGGGTGGCCTTCAAGGACT
TGTCGCAGGCGCAGCTGCAGCATTACATGAAGGAGAGCGCCAGATCCTCTCGGAAAAGATCGCCTACAA
GAGCGCGGAGTTTCGGCCGCGGCTCGCCGAGCAGCAAGCCCAAAGTTTTTCACGTGCGAAGTTTGCGGAAAG
GTATTCAATGCACACTATAACCTAACTCGCCACATGCCGGTGCACACGGGAGCCAGACCCTTCGTTTGCA
AAGTTTGCGGGAAGGGCTTCAGGCAGGCGAGCACGCTGTGCCGCCACAAGATCATTCACACGCAGGGAGA
AGCCCCACAAGTGCAACCAAGTGCAGGCAAAGCCTTCAACCGAAGTTCGACCCTGAACACGCACACGCGGAT
CCACGCCGGCTACAAACCTTTGTCTGTGAATTCGTGGCAAAGGGTTTCACCAGAAAGGCAACTACAAA
AACCACAAGCTGACCCACAGCGGGGAGAAGCAATTCAGTGCAATATCTGCAACAAGGCTTTCCACCAGG
TGTACAACCTCACTTCCATATGCACACCCACAACGATAAGAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACAC
TGGCGGCCGCTCGAGCATGCA
```

## 4. Preparación de las muestras.

### Obtención de embriones de pollo para fijación y posterior ISH o para extracción de ARN:

Para la disección de embriones de pollo se utilizó un soporte especial donde acoplar el huevo durante la disección.

Pasos a seguir:

1. Coger el huevo de la bandeja de incubación recordando siempre que parte estaba hacia arriba (es en la parte donde se encuentra el embrión), voltear varias veces el huevo y colocarlo en la plataforma con la misma orientación que tenía.
2. Con una pinza, hacer un pequeño orificio en la parte trasera del huevo (donde está la cámara de aire). Hacer otro orificio en la parte superior, sin rasgar la membrana.
3. Esperar un poco a que entre el aire y la membrana se retraiga de la parte superior.



4. Abrir una ventana en la cáscara del huevo y una vez localizado el embrión, romper la cáscara hasta poder verlo completamente.
5. Cortar un círculo de papel de filtro con un orificio central del tamaño del embrión. Poner el círculo de papel sobre el embrión y presionar levemente para que se adhiera. Levantar suavemente y recortar con unas tijeras de disección la membrana vitelina de alrededor.
6. Depositar el embrión en una placa de Petri con PBS 1x para lavarlo.
7. Para la fijación de los especímenes, pasar los embriones a una placa con Formaldehído 4% en PBS y dejar fijando toda la noche a 4 °C.
8. Para la extracción de ARN, una vez en PBS, se retira toda la placenta y demás membranas, dependiendo del estadio. Se disecan las vesículas ópticas (u ojos, dependiendo del estadio) y el tubo neural, intentando retirar el resto de tejido y mesénquima. Las muestras (unos 6 embriones) se colocan en un tubo vacío en hielo al que se le añade ARN later (del kit RNeasy de QUIAGEN) y se puede almacenar a -80°C hasta el momento de extracción de ARN.

### **Obtención de embriones de ratón para fijación**

Los embriones de ratón se obtuvieron de madres gestantes silvestres. Se detuvo la gestación a diferentes estadios.

Los embriones se extrajeron de cada útero y se retiraron las placentas, cada embrión fue sacrificado inmediatamente tras su extracción del útero. De algunos embriones se obtuvieron las cabezas para su fijación y realización de cortes histológicos, posteriormente. De otros embriones se disecaron cuidadosamente los ojos junto con el tejido circundante para fijarlos y realizar las secciones. Las muestras se incubaron toda la noche en 4% formaldehído en PBS y posteriormente se pasaron a 4% de formaldehído en 50% de parafina para crear los bloques.

### **Hibridación *in situ***

La hibridación *in situ* tanto en pollo como en ratón se llevó a cabo en secciones hechas con vibratomo, así como en embriones de pollo completos, siguiendo los protocolos descritos en Riddle et al., 1993; Engelkamp et al., 1999; Schulte et al., 1999 y Bumsted-O'Brien et al., 2007).





## Referencias:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F. M., Michaud, J. and Simeone, A.** (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev.* **13**, 2787–2800.
- Ahmad, I., Tang, L. and Pham, H.** (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 517–521.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. and Hooper, J. E.** (1996). The *Drosophila* *smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* **86**, 221–232.
- Alexandre, C., Jacinto, A. and Ingham, P. W.** (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **10**, 2003–2013.
- Alunni, A., Krecsmarik, M., Bosco, A., Galant, S., Pan, L., Moens, C. B. and Bally-Cuif, L.** (2013). Notch3 signaling gates cell cycle entry and limits neural stem cell amplification in the adult pallium. *Development* **140**, 3335–3347.
- Amato, M. A., Arnault, E. and Perron, M.** (2004). Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 993–1001.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. and Rubenstein, J. L.** (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* **278**, 474–476.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E. and Barsacchi, G.** (1999). Role of *Xrx1* in *Xenopus* eye and anterior brain development. *Development* **126**, 2451–2460.
- Arendt, D.** (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* **47**, 563–571.
- Arendt, D. and Wittbrodt, J.** (2001). Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356**, 1545–1563.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A. W. and Wittbrodt, J.** (2004). Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* **306**, 869–871.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. and Gruss, P.** (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* **14**, 2701–2711.

- Bae, Y.-K., Shimizu, T., Yabe, T., Kim, C.-H., Hirata, T., Nojima, H., Muraoka, O., Hirano, T. and Hibi, M.** (2003). A homeobox gene, *pnx*, is involved in the formation of posterior neurons in zebrafish. *Development* **130**, 1853–1865.
- Bangs, P. and White, K.** (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev. Dyn.* **218**, 68–79.
- Baonza, A. and Freeman, M.** (2005). Control of cell proliferation in the *Drosophila* eye by Notch signaling. *Dev. Cell* **8**, 529–539.
- Barbieri, A. M., Lupo, G., Bulfone, A., Andreazzoli, M., Mariani, M., Fougerousse, F., Consalez, G. G., Borsani, G., Beckmann, J. S., Barsacchi, G., et al.** (1999). A homeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10729–10734.
- Beby, F. and Lamonerie, T.** (2013). The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp. Eye Res.* **111**, 9–16.
- Berberoglu, M. A., Dong, Z., Li, G., Zheng, J., Trejo Martinez, L. del C. G., Peng, J., Wagle, M., Reichholf, B., Petritsch, C., Li, H., et al.** (2014). Heterogeneously expressed *fezf2* patterns gradient Notch activity in balancing the quiescence, proliferation, and differentiation of adult neural stem cells. *J. Neurosci.* **34**, 13911–13923.
- Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S. H., O’Leary, D. D. and Lemke, G.** (1999). The homeodomain protein *vax1* is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes Dev.* **13**, 3092–3105.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F. and Mann, R. S.** (2002). Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes Dev.* **16**, 2415–2427.
- Bessa, J., Carmona, L. and Casares, F.** (2009). Zinc-finger paralogues *tsh* and *tio* are functionally equivalent during imaginal development in *Drosophila* and maintain their expression levels through auto- and cross-negative feedback loops. *Dev. Dyn.* **238**, 19–28.
- Bessarab, D. A., Chong, S.-W. and Korzh, V.** (2004). Expression of zebrafish *six1* during sensory organ development and myogenesis. *Dev. Dyn.* **230**, 781–786.
- Bier, E., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. and Jan, Y. N.** (1988). Identification and characterization of a neuron-specific nuclear antigen in *Drosophila*. *Science* **240**, 913–916.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 3312–3317.

- Blackman, R. K., Sanicola, M., Raftery, L. A., Gillevet, T. and Gelbart, W. M.** (1991). An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development* **111**, 657–666.
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R. E., Cho, S.-H., et al.** (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol.* **2**, E247.
- Blechman, J., Borodovsky, N., Eisenberg, M., Nabel-Rosen, H., Grimm, J. and Levkowitz, G.** (2007). Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* **134**, 4417–4426.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M. and Benzer, S.** (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **72**, 379–395.
- Bonini, N. M., Bui, Q. T., Gray-Board, G. L. and Warrick, J. M.** (1997). The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* **124**, 4819–4826.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M. and Benzer, S.** (1998). Multiple Roles of the eyes absent Gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **196**, 42–57.
- Borsani, G.** (1999). EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 11–23.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595–601.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Briata, P., Corte, G. and Boncinelli, E.** (1997). Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *J. Neurosci.* **17**, 4243–4252.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L. and Boncinelli, E.** (1998). Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech. Dev.* **70**, 201–203.
- Boyle, M., Bonini, N. and DiNardo, S.** (1997). Expression and function of clift in the development of somatic gonadal precursors within the *Drosophila* mesoderm. *Development* **124**, 971–982.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993a). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Bras-Pereira, C., Casares, F. and Janody, F.** (2015). The retinal determination



- gene dachshund restricts cell proliferation by limiting the activity of the Homothorax-Yorkie complex. *Development* **142**, 1470–1479.
- Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 678–689.
- Brewster, R., Lee, J. and Ruiz i Altaba, A.** (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* **393**, 579–583.
- Brockmann, A., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G. and Casares, F.** (2011a). Regulation of ocellar specification and size by twin of eyeless and homothorax. *Dev. Dyn.* **240**, 75–85.
- Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J. and Glaser, T.** (2001). Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development* **128**, 2497–2508.
- Brzezinski, J. A., 4th, Uoon Park, K. and Reh, T. A.** (2013). Blimp1 (Prdm1) prevents re-specification of photoreceptors into retinal bipolar cells by restricting competence. *Dev. Biol.* **384**, 194–204.
- Bumsted-O'Brien, K. M., Hendrickson, A., Haverkamp, S., Ashery-Padan, R. and Schulte, D.** (2007). Expression of the homeodomain transcription factor Meis2 in the embryonic and postnatal retina. *J. Comp. Neurol.* **505**, 58–72.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M. Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N. L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V. I., et al.** (1996). Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat. Genet.* **12**, 376–384.
- Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W. J.** (1997). PAX-6 in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 483–532.
- Callaerts, P., Leng, S., Clements, J., Benassayag, C., Cribbs, D., Kang, Y. Y., Walldorf, U., Fischbach, K. F. and Strauss, R.** (2001). Drosophila Pax-6/eyeless is essential for normal adult brain structure and function. *J. Neurobiol.* **46**, 73–88.
- Campos--- Ortega JA y Hartenstein V** (1985) Development of the nervous system. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology, vol 5. Pergamon Press, Oxford, pp 49-- - 85
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1985). Stages of Drosophila Embryogenesis. In *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, pp. 9–84.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*.

- Carl, M. and Wittbrodt, J.** (1999). Graded interference with FGF signalling reveals its dorsoventral asymmetry at the mid-hindbrain boundary. *Development* **126**, 5659–5667.
- Carlén, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabé-Heider, F., Yeung, M. S. Y., Naldini, L., et al.** (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.* **12**, 259–267.
- Castro, L. F. C., Rasmussen, S. L. K., Holland, P. W. H., Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (2006). A Gbx homeobox gene in amphioxus: insights into ancestry of the ANTP class and evolution of the midbrain/hindbrain boundary. *Dev. Biol.* **295**, 40–51.
- Cepko, C. L.** (1996a). The patterning and onset of opsin expression in vertebrate retinæ. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 542–546.
- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M. and Ezzeddine, D.** (1996b). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 589–595.
- Chang, T., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V.** (2003). Development of neural lineages derived from the sine oculis positive eye field of *Drosophila*. *Arthropod Struct. Dev.* **32**, 303–317.
- Chapouton, P., Skupien, P., Hesi, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D., et al.** (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J. Neurosci.* **30**, 7961–7974.
- Chen, T.-Y.** (1929). *On the Development of Imaginal Buds in Normal and Mutant Drosophila melanogaster ... [A thesis.] Reprinted from "The Journal of Morphology and Physiology."*
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. and Mardon, G.** (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* **91**, 893–903.
- Chen, R., Halder, G., Zhang, Z. and Mardon, G.** (1999). Signaling by the TGF-beta homolog decapentaplegic functions reiteratively within the network of genes controlling retinal cell fate determination in *Drosophila*. *Development* **126**, 935–943.
- Chen, B., Schaevitz, L. R. and McConnell, S. K.** (2005a). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17184–17189.
- Chen, J.-G., Rasin, M.-R., Kwan, K. Y. and Sestan, N.** (2005b). Zfp312 is required

for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17792–17797.

**Chen, L., Zheng, J., Yang, N., Li, H. and Guo, S.** (2011). Genomic selection identifies vertebrate transcription factor Fezf2 binding sites and target genes. *J. Biol. Chem.* **286**, 18641–18649.

**Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. and Zipursky, S. L.** (1994a). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* **12**, 977–996.

**Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407–413.

**Chotard, C., Leung, W. and Salecker, I.** (2005). glial cells missing and gcm2 cell autonomously regulate both glial and neuronal development in the visual system of *Drosophila*. *Neuron* **48**, 237–251.

**Chow, R. L. and Lang, R. A.** (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 255–296.

**Conlon, I. and Raff, M.** (1999). Size Control in Animal Development. *Cell* **96**, 235–244.

**Coulombre, J. L. and Coulombre, A. J.** (1965). Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev. Biol.* **12**, 79–92.

**Curtiss, J. and Mlodzik, M.** (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* **127**, 1325–1336.

**Cvekl, A. and Piatigorsky, J.** (1996). Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* **18**, 621–630.

**Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J. and Busslinger, M.** (1999a). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol. Cell* **3**, 297–307.

**Daniel, A., Dumstrei, K., Lengyel, J. A. and Hartenstein, V.** (1999). The control of cell fate in the embryonic visual system by atonal, tailless and EGFR signaling. *Development* **126**, 2945–2954.

**Darwin C.** (1859) On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. Vol. 186. John Murray

- Datta, R. R., Lurye, J. M. and Kumar, J. P.** (2009). Restriction of ectopic eye formation by *Drosophila* teashirt and tiptop to the developing antenna. *Dev. Dyn.* **238**, 2202–2210.
- Datta, R. R., Weasner, B. P. and Kumar, J. P.** (2011). A dissection of the teashirt and tiptop genes reveals a novel mechanism for regulating transcription factor activity. *Dev. Biol.* **360**, 391–402.
- Dattani, M. T., Martinez-Barbera, J. P., Thomas, P. Q., Brickman, J. M., Gupta, R., Mårtensson, I. L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J. K., Hindmarsh, P. C., et al.** (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet.* **19**, 125–133.
- Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C. H. and Tsonis, P. A.** (1995). Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5092–5096.
- de Melo, J., Zhou, Q.-P., Zhang, Q., Zhang, S., Fonseca, M., Wigle, J. T. and Eisenstat, D. D.** (2008). Dlx2 homeobox gene transcriptional regulation of Trkb neurotrophin receptor expression during mouse retinal development. *Nucleic Acids Res.* **36**, 872–884.
- Desplan, C.** (1997). Eye development: governed by a dictator or a junta? *Cell* **91**, 861–864.
- Detwiler, S. R. and Van Dyke, R. H.** (1953). The induction of neural retina from the pigment epithelial layer of the eye. *J. Exp. Zool.* **122**, 367–383.
- Dohrmann, C., Azpiazu, N. and Frasch, M.** (1990). A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev.* **4**, 2098–2111.
- Domínguez, M. and Casares, F.** (2005a). Organ specification-growth control connection: new in-sights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev. Dyn.* **232**, 673–684.
- Dominguez, M. and Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 3254–3264.
- Donnenberg, V. S. and Donnenberg, A. D.** (2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 872–877.
- Dong, Z., Yang, N., Yeo, S.-Y., Chitnis, A. and Guo, S.** (2012). Intralineage directional Notch signaling regulates self-renewal and differentiation of asymmetrically dividing radial glia. *Neuron* **74**, 65–78.
- Donner, A. L. and Maas, R. L.** (2004). Conservation and non-conservation of

genetic pathways in eye specification. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 743–753.

**Dorval, K. M., Bobechko, B. P., Fujieda, H., Chen, S., Zack, D. J. and Bremner, R.** (2006). CHX10 targets a subset of photoreceptor genes. *J. Biol. Chem.* **281**, 744–751.

**Duffy, J. B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1–15.

**Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L. and Oliver, G.** (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat. Genet.* **34**, 53–58.

**Egger, B., Boone, J. Q., Stevens, N. R., Brand, A. H. and Doe, C. Q.** (2007). Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Dev.* **2**, 1.

**England, S. J., Blanchard, G. B., Mahadevan, L. and Adams, R. J.** (2006). A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* **133**, 4613–4617.

**Erclik, T., Hartenstein, V., Lipshitz, H. D. and McInnes, R. R.** (2008). Conserved role of the *Vsx* genes supports a monophyletic origin for bilaterian visual systems. *Curr. Biol.* **18**, 1278–1287.

**Erclik, T., Hartenstein, V., McInnes, R. R. and Lipshitz, H. D.** (2009). Eye evolution at high resolution: the neuron as a unit of homology. *Dev. Biol.* **332**, 70–79.

**Erickson, T., French, C. R. and Waskiewicz, A. J.** (2010). *Meis1* specifies positional information in the retina and tectum to organize the zebrafish visual system. *Neural Dev.* **5**, 22.

**Fadool, J. and Dowling, J.** (2008). Zebrafish: A model system for the study of eye genetics. *Prog. Retin. Eye Res.* **27**, 89–110.

**Fasano, L., Röder, L., Coré, N., Alexandre, E., Vola, C., Jacq, B. and Kerridge, S.** (1991a). The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* **64**, 63–79.

**Fini, M. E., Strissel, K. J. and West-Mays, J. A.** (1997). Perspectives on eye development. *Dev. Genet.* **20**, 175–185.

**Firth, L. C. and Baker, N. E.** (2009). Retinal determination genes as targets and possible effectors of extracellular signals. *Dev. Biol.* **327**, 366–375.

**Fischbach, K. F. and Technau, G.** (1984). Cell degeneration in the developing optic

- lobes of the sine oculis and small-optic-lobes mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **104**, 219–239.
- Fischbach, K.-F. and Dittrich, A. P. M.** (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res.* **258**,.
- Fischer, A. J. and Reh, T. A.** (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev. Biol.* **220**, 197–210.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. and Ptashne, M.** (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**, 853–856.
- Fischer, A. J., Bosse, J. L. and El-Hodiri, H. M.** (2013). The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp. Eye Res.* **116**, 199–204.
- Flegel, W. A., Singson, A. W., Margolis, J. S., Bang, A. G., Posakony, J. W. and Murre, C.** (1993). Dpbx, a new homeobox gene closely related to the human proto-oncogene pbx1 molecular structure and developmental expression. *Mech. Dev.* **41**, 155–161.
- Fu, W. and Baker, N. E.** (2003). Deciphering synergistic and redundant roles of Hedgehog, Decapentaplegic and Delta that drive the wave of differentiation in *Drosophila* eye development. *Development* **130**, 5229–5239.
- Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R. J., Furukawa, T., et al.** (2006). Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* **133**, 4439–4450.
- Furukawa, T., Morrow, E. M. and Cepko, C. L.** (1997). Crx, a Novel otx-like Homeobox Gene, Shows Photoreceptor-Specific Expression and Regulates Photoreceptor Differentiation. *Cell* **91**, 531–541.
- Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C. and Cepko, C. L.** (1999). Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat. Genet.* **23**, 466–470.
- Furukubo-Tokunaga, K., Adachi, Y., Kurusu, M. and Walldorf, U.** (2009). Brain patterning defects caused by mutations of the twin of eyeless gene in *Drosophila melanogaster*. *Fly* **3**, 263–269.
- Furuta, Y. and Hogan, B. L.** (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3764–3775.
- Gaiano, N. and Fishell, G.** (2002). THE ROLE OF NOTCH IN PROMOTING GLIAL AND NEURAL STEM CELL FATES. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 471–490.

- Galy, A., Néron, B., Planque, N., Saule, S. and Eychène, A.** (2002). Activated MAPK/ERK kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina. *Dev. Biol.* **248**, 251–264.
- Gamse, J. T. and Sive, H.** (2001). Early anteroposterior division of the presumptive neurectoderm in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **104**, 21–36.
- Gehring, W. J.** (2002). The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 65–73.
- Gehring, W. J.** (2005). New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J. Hered.* **96**, 171–184.
- Ghai, K., Stanke, J. J. and Fischer, A. J.** (2008). Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain Res.* **1192**, 76–89.
- Glardon, S., Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W. J.** (1997). Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development* **124**, 817–825.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357–362.
- Golic, K. G. and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the drosophila genome. *Cell* **59**, 499–509.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferré-Marcó, D. and Modolell, J.** (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**, 95–105.
- González-Crespo, S. and Morata, G.** (1995). Control of *Drosophila* adult pattern by extradenticle. *Development* **121**, 2117–2125.
- Granadino, B., Gallardo, M. E., López-Ríos, J., Sanz, R., Ramos, C., Ayuso, C., Bovolenta, P. and Rodríguez de Córdoba, S.** (1999). Genomic cloning, structure, expression pattern, and chromosomal location of the human SIX3 gene. *Genomics* **55**, 100–105.
- Graw, J.** (1996). Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates. *Dev. Genet.* **18**, 181–197.
- Green, P., Hartenstein, A. Y. and Hartenstein, V.** (1993). The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res.* **273**, 583–598.
- Green, E. S., Stubbs, J. L. and Levine, E. M.** (2003). Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-



- phase cell cycle regulators. *Development* **130**, 539–552.
- Greenwood, S. and Struhl, G.** (1999). Progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye: the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development* **126**, 5795–5808.
- Grenningloh, G., Rehm, E. J. and Goodman, C. S.** (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* **67**, 45–57.
- Grindley, J. C., Davidson, D. R. and Hill, R. E.** (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433–1442.
- Guillemot, F. and Cepko, C. L.** (1992). Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development. *Development* **114**, 743–754.
- Guo, S., Wilson, S. W., Cooke, S., Chitnis, A. B., Driever, W. and Rosenthal, A.** (1999). Mutations in the zebrafish unmask shared regulatory pathways controlling the development of catecholaminergic neurons. *Dev. Biol.* **208**, 473–487.
- Hägglund, A.-C., Dahl, L. and Carlsson, L.** (2011). Lhx2 is required for patterning and expansion of a distinct progenitor cell population committed to eye development. *PLoS One* **6**, e23387.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995a). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788–1792.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995b). New perspectives on eye evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 602–609.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J.** (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Development* **125**, 2181–2191.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Pieler, T. and Gruss, P.** (1999). Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* **13**, 3106–3114.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* **195**, 231–272.
- Hammond, K. L., Hanson, I. M., Brown, A. G., Lettice, L. A. and Hill, R. E.** (1998). Mammalian and *Drosophila* dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech. Dev.* **74**, 121–131.

- Hartenstein, V. and Posakony, J. W.** (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389–405.
- Hartenstein, V. and Reh, T. A.** (2002). Homologies between vertebrate and invertebrate eyes. *Results Probl. Cell Differ.* **37**, 219–255.
- Hasegawa, E., Kitada, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T. and Sato, M.** (2011). Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the *Drosophila* visual center. *Development* **138**, 983–993.
- Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Shimizu, T., Bae, Y., Yamanaka, Y., Hirano, T. and Hibi, M.** (2000). Expression of the zinc finger gene *fez*-like in zebrafish forebrain. *Mech. Dev.* **97**, 191–195.
- Hauck, B., Gehring, W. J. and Walldorf, U.** (1999). Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 564–569.
- Hayden, M. A., Akong, K. and Peifer, M.** (2007). Novel roles for APC family members and Wingless/Wnt signaling during *Drosophila* brain development. *Dev. Biol.* **305**, 358–376.
- Haynie, J. L. and Bryant, P. J.** (1986). Development of the eye-antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **237**, 293–308.
- Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B. and Tabin, C. J.** (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2*, and *Six1*, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev.* **13**, 3231–3243.
- Heberlein, U., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1993). The TGF beta homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* **75**, 913–926.
- Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R., et al.** (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev.* **15**, 1427–1434.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. and Melton, D. A.** (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283–295.
- Henry, J. J. and Grainger, R. M.** (1990). Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **141**, 149–163.

- Hermesz, E., Mackem, S. and Mahon, K. A.** (1996). Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* **122**, 41–52.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. and van Heyningen, V.** (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522–525.
- Hirashima, M., Kobayashi, T., Uchikawa, M., Kondoh, H. and Araki, M.** (2008). Anteroventrally localized activity in the optic vesicle plays a crucial role in the optic development. *Dev. Biol.* **317**, 620–631.
- Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T. and Hibi, M.** (2004). Zinc finger gene fez-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev. Dyn.* **230**, 546–556.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y. and Hibi, M.** (2006). Zinc-finger genes Fez and Fez-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* **133**, 3993–4004.
- Hirose, Y.** (2004). Single cell lineage and regionalization of cell populations during Medaka neurulation. *Development* **131**, 2553–2563.
- Hirsch, N. and Harris, W. A.** (1997). Xenopus Pax-6 and retinal development. *J. Neurobiol.* **32**, 45–61.
- Hirth, F., Kammermeier, L., Frei, E., Walldorf, U., Noll, M. and Reichert, H.** (2003). An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from Drosophila. *Development* **130**, 2365–2373.
- Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A. and Otteson, D.** (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **23**, 183–194.
- Hofbauer, A. and Campos-Ortega, J. A.** (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in Drosophila melanogaster. *Rouxs. Arch. Dev. Biol.* **198**, 264–274.
- Hogan, B. L. M.** (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 432–438.
- Hogan, B. L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C. M., Fisher, G. and Lyon, M. F.** (1986). Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97**, 95–110.
- Holland, L. Z. and Short, S.** (2008a). Gene duplication, co-option and recruitment

during the origin of the vertebrate brain from the invertebrate chordate brain. *Brain Behav. Evol.* **72**, 91–105.

**Holland, L. Z., Holland, N. D. and Gilland, E.** (2008b). Amphioxus and the evolution of head segmentation. *Integr. Comp. Biol.* **48**, 630–646.

**Holtfreter J.** (1939). Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. *Arch. Exp. Zellforsch* 23:169–209

**Horsford, D. J., Nguyen, M.-T. T., Sellar, G. C., Kothary, R., Arnheiter, H. and McInnes, R. R.** (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* **132**, 177–187.

**Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y.** (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025–1036.

**Hrdlicka, L., Gibson, M., Kiger, A., Micchelli, C., Schober, M., Schöck, F. and Perrimon, N.** (2002a). Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **34**, 51–57.

**Hu, M. and Easter, S. S.** (1999). Retinal Neurogenesis: The Formation of the Initial Central Patch of Postmitotic Cells. *Dev. Biol.* **207**, 309–321.

**Huang, Z. and Kunes, S.** (1996a). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**, 411–422.

**Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T.** (1998). FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* **125**, 869–877.

**Ikeda, K., Watanabe, Y., Ohto, H. and Kawakami, K.** (2002a). Molecular interaction and synergistic activation of a promoter by Six, Eya, and Dach proteins mediated through CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6759–6766.

**Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and Kageyama, R.** (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J. Neurosci.* **30**, 3489–3498.

**Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E. and Kageyama, R.** (2002). Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* **129**, 831–842.

**Irimia, M., Piñeiro, C., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J. L., Casares, F. and Garcia-Fernández, J.** (2010). Conserved developmental expression of Fezf in chordates and *Drosophila* and the origin of the Zona Limitans Intrathalamica

(ZLI) brain organizer. *Evodevo* **1**, 7.

**Jean, D., Bernier, G. and Gruss, P.** (1999). Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev.* **84**, 31–40.

**Jékely, G. and Arendt, D.** (2007). Cellular resolution expression profiling using confocal detection of NBT/BCIP precipitate by reflection microscopy. *Biotechniques* **42**, 751–755.

**Jeong, J.-Y., Einhorn, Z., Mercurio, S., Lee, S., Lau, B., Mione, M., Wilson, S. W. and Guo, S.** (2006). Neurogenin1 is a determinant of zebrafish basal forebrain dopaminergic neurons and is regulated by the conserved zinc finger protein Tof/Fezl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5143–5148.

**Jeong, J.-Y., Einhorn, Z., Mathur, P., Chen, L., Lee, S., Kawakami, K. and Guo, S.** (2007). Patterning the zebrafish diencephalon by the conserved zinc-finger protein Fezl. *Development* **134**, 127–136.

**Jiang, C., Baehrecke, E. H. and Thummel, C. S.** (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**, 4673–4683.

**Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013–1023.

**Kagiyama, Y., Gotouda, N., Sakagami, K., Yasuda, K., Mochii, M. and Araki, M.** (2005). Extraocular dorsal signal affects the developmental fate of the optic vesicle and patterns the optic neuroepithelium. *Dev. Growth Differ.* **47**, 523–536.

**Kaiser, R., Posteguillo, E. G., Müller, D. and Just, W.** (2007). Exclusion of genes from the EYA-DACH-SIX-PAX pathway as candidates for Branchio-Oculo-Facial syndrome (BOFS). *Am. J. Med. Genet. A* **143A**, 2185–2188.

**Kakidani, H. and Ptashne, M.** (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* **52**, 161–167.

**Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R. and Kondoh, H.** (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* **125**, 2521–2532.

**Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. and Kondoh, H.** (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.* **15**, 1272–1286.

**Kaphingst, K. and Kunes, S.** (1994a). Pattern formation in the visual centers of the

Drosophila brain: wingless acts via decapentaplegic to specify the dorsoventral axis. *Cell* **78**, 437–448.

**Kawakami, K., Ohto, H., Takizawa, T. and Saito, T.** (1996). Identification and expression of six family genes in mouse retina. *FEBS Lett.* **393**, 259–263.

**Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, H. and Ikeda, K.** (2000). Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* **22**, 616–626.

**Kenyon, K. L., Ranade, S. S., Curtiss, J., Mlodzik, M. and Pignoni, F.** (2003). Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the Drosophila head. *Dev. Cell* **5**, 403–414.

**Kenyon, K. L., Li, D. J., Clouser, C., Tran, S. and Pignoni, F.** (2005). Fly SIX-type homeodomain proteins Sine oculis and Optix partner with different cofactors during eye development. *Dev. Dyn.* **234**, 497–504.

**Kiecker, C. and Lumsden, A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 553–564.

**Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. *Development* **128**, 4189–4201.

**Kim, S.-S., Zhang, R.-G., Braunstein, S. E., Joachimiak, A., Cvekl, A. and Hegde, R. S.** (2002). Structure of the retinal determination protein Dachshund reveals a DNA binding motif. *Structure* **10**, 787–795.

**Kobayashi, M., Nishikawa, K., Suzuki, T. and Yamamoto, M.** (2001). The homeobox protein Six3 interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation. *Dev. Biol.* **232**, 315–326.

**Komuta, Y., Hibi, M., Arai, T., Nakamura, S. and Kawano, H.** (2007). Defects in reciprocal projections between the thalamus and cerebral cortex in the early development of Fezl-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* **503**, 454–465.

**Kozmik, Z., Pfeffer, P., Kralova, J., Paces, J., Paces, V., Kalousova, A. and Cvekl, A.** (1999). Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the Drosophila dachshund gene. *Dev. Genes Evol.* **209**, 537–545.

**Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. and Fjose, A.** (1991). Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development* **113**, 1193–1206.

**Kubota, R., Hokoc, J. N., Moshiri, A., McGuire, C. and Reh, T. A.** (2002). A

comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **134**, 31–41.

**Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001). EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell* **104**, 687–697.

**Kuo, J. S., Patel, M., Gamse, J., Merzdorf, C., Liu, X., Apekin, V. and Sive, H.** (1998). Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in *Xenopus*. *Development* **125**, 2867–2882.

**Kurusu, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W. J. and Furukubo-Tokunaga, K.** (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the *Drosophila* brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2140–2144.

**Laessing, U. and Stuermer, C. A.** (1996). Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurolin in embryonic zebrafish. *J. Neurobiol.* **29**, 65–74.

**Lamb, T. D.** (2009). Evolution of vertebrate retinal photoreception. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**, 2911–2924.

**Lamb, T. D.** (2013). Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **36**, 52–119.

**Lamb, T. D., Collin, S. P. and Pugh, E. N.** (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 960–976.

**Larsen, C. W., Zeltser, L. M. and Lumsden, A.** (2001). Boundary formation and compartition in the avian diencephalon. *J. Neurosci.* **21**, 4699–4711.

**Laugier, E., Yang, Z., Fasano, L., Kerridge, S. and Vola, C.** (2005a). A critical role of teashirt for patterning the ventral epidermis is masked by ectopic expression of tiptop, a paralog of teashirt in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **283**, 446–458.

**Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387–393.

**Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron* **22**, 451–461.

**Lee, T. and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24**, 251–254.

**Leiserson, W. M., Bonini, N. M. and Benzer, S.** (1994). Transvection at the eyes absent gene of *Drosophila*. *Genetics* **138**, 1171–1179.

- Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S. and Moon, R. T.** (2001). Zebrafish *wnt8* encodes two *wnt8* proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Dev. Cell* **1**, 103–114.
- Lennington, J. B., Yang, Z. and Conover, J. C.** (2003). Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 99.
- Levkowitz, G., Zeller, J., Sirotkin, H. I., French, D., Schilbach, S., Hashimoto, H., Hibi, M., Talbot, W. S. and Rosenthal, A.** (2003). Zinc finger protein too few controls the development of monoaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* **6**, 28–33.
- Li, F., Tiede, B., Massagué, J. and Kang, Y.** (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* **17**, 3–14.
- Li, H. S., Yang, J. M., Jacobson, R. D., Pasko, D. and Sundin, O.** (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev. Biol.* **162**, 181–194.
- Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W., et al.** (2003). Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**, 247–254.
- Li, S., Mo, Z., Yang, X., Price, S. M., Shen, M. M. and Xiang, M.** (2004). Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* **43**, 795–807.
- Lindsey, B. W., Darabie, A. and Tropepe, V.** (2012). The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J. Comp. Neurol.* **520**, 2275–2316.
- Livesey, F. J. and Cepko, C. L.** (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 109–118.
- Livne-Bar, I., Pacal, M., Cheung, M. C., Hankin, M., Trogadis, J., Chen, D., Dorval, K. M. and Bremner, R.** (2006). Chx10 is required to block photoreceptor differentiation but is dispensable for progenitor proliferation in the postnatal retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4988–4993.
- Loosli, F., Köster, R. W., Carl, M., Krone, A. and Wittbrodt, J.** (1998). Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech. Dev.* **74**, 159–164.
- Lopashov, G. V. and Stroeve, O. G.** (1964). *Development of the eye: experimental studies.*



- Lopes, C. S. and Casares, F.** (2010a). hth maintains the pool of eye progenitors and its downregulation by Dpp and Hh couples retinal fate acquisition with cell cycle exit. *Dev. Biol.* **339**, 78–88.
- Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 93–102.
- Lowe, C. J., Terasaki, M., Wu, M., Freeman, R. M., Jr, Runft, L., Kwan, K., Haigo, S., Aronowicz, J., Lander, E., Gruber, C., et al.** (2006). Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biol.* **4**, e291.
- Ma, J., Przibilla, E., Hu, J., Bogorad, L. and Ptashne, M.** (1988). Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* **334**, 631–633.
- Mandaravally Madhavan, M. and Schneiderman, H. A.** (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **183**, 269–305.
- Manseau, L., Baradaran, A., Brower, D., Budhu, A., Elefant, F., Phan, H., Philp, A. V., Yang, M., Glover, D., Kaiser, K., et al.** (1997a). GAL4 enhancer traps expressed in the embryo, larval brain, imaginal discs, and ovary of *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **209**, 310–322.
- Mardon, G., Solomon, N. M. and Rubin, G. M.** (1994a). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473–3486.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P.** (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43–55.
- Martínez, S.** (2001). The isthmus organizer and brain regionalization. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 367–371.
- Martinez-Barbera, J. P., Signore, M., Boyl, P. P., Puelles, E., Acampora, D., Gogoi, R., Schubert, F., Lumsden, A. and Simeone, A.** (2001). Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development* **128**, 4789–4800.
- Martinez-Morales, J.-R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P. and Wittbrodt, J.** (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Dev. Cell* **8**, 565–574.
- Martínez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martín-Nieto, J. and Cuenca, N.** (2008). Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of

- adult monkeys and humans. *J. Comp. Neurol.* **511**, 557–580.
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesi, B., Takamiya, M., Lam, C. S., Kah, O., Bally-Cuif, L. and Strähle, U.** (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia* **58**, 870–888.
- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H. and Wilson, S. W.** (2000). Midline Signals Regulate Retinal Neurogenesis in Zebrafish. *Neuron* **27**, 251–263.
- Masland, R. H.** (2012). The tasks of amacrine cells. *Vis. Neurosci.* **29**, 3–9.
- Massagué, J. and Chen, Y. G.** (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* **14**, 627–644.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. and Jamrich, M.** (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**, 603–607.
- Matsuo-Takasaki, M., Lim, J. H., Beanan, M. J., Sato, S. M. and Sargent, T. D.** (2000). Cloning and expression of a novel zinc finger gene, Fez, transcribed in the forebrain of Xenopus and mouse embryos. *Mech. Dev.* **93**, 201–204.
- McCabe, K. L., Gunther, E. C. and Reh, T. A.** (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* **126**, 5713–5724.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. and Simon, M. A.** (1997). mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the Drosophila eye. *Genes Dev.* **11**, 1073–1082.
- Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A. and Swaroop, A.** (2001). Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat. Genet.* **29**, 447–452.
- Meinertzhagen, I. A. and O'Neil, S. D.** (1991). Synaptic organization of columnar elements in the lamina of the wild type in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* **305**, 232–263.
- Mikami Y.** (1939). Reciprocal transformation of the parts in the developing eye-vesicle, with special reference to the inductive influence of the lens-ectoderm on the retinal determination. *Zool. Mag.* **51**:253–56
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Pyott, A.** (1983). The role of the peripodial membrane in the morphogenesis of the eye-antennal disc of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **192**, 164–170.

- Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S. and Sasai, Y.** (1998). *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* **125**, 579–587.
- Mizutani, K.-I., Yoon, K., Dang, L., Tokunaga, A. and Gaiano, N.** (2007). Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* **449**, 351–355.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M. and Macklis, J. D.** (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* **47**, 817–831.
- Morante, J., Erclik, T. and Desplan, C.** (2011). Cell migration in *Drosophila* optic lobe neurons is controlled by eyeless/Pax6. *Development* **138**, 687–693.
- Morgan, T. H.** (1910). THE AMERICAN SOCIETY OF NATURALISTS CHANCE OR PURPOSE IN THE ORIGIN AND EVOLUTION OF ADAPTATION. *Science* **31**, 201–210.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15050–15055.
- Moshiri, A., Close, J. and Reh, T. A.** (2004). Retinal stem cells and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 1003–1014.
- Moskow, J. J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I. O. and Buchberg, A. M.** (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5434–5443.
- Motzny, C. K. and Holmgren, R.** (1995). The *Drosophila* cubitus interruptus protein and its role in the wingless and hedgehog signal transduction pathways. *Mech. Dev.* **52**, 137–150.
- Mu, X. and Klein, W. H.** (2004). A gene regulatory hierarchy for retinal ganglion cell specification and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 115–123.
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2001). Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **104**, 861–873.
- Mui, S. H., Hindges, R., O’Leary, D. D. M., Lemke, G. and Bertuzzi, S.** (2002). The homeodomain protein Vax2 patterns the dorsoventral and nasotemporal axes of the eye. *Development* **129**, 797–804.
- Mui, S. H., Kim, J. W., Lemke, G. and Bertuzzi, S.** (2005). Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev.* **19**, 1249–1259.

- Murakami Y. and Kuratani S.** (2005a). [Evolution of the vertebrate brain: insights from the lamprey brain development]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **50**, 876–885.
- Murakami, Y., Uchida, K., Rijli, F. M. and Kuratani, S.** (2005b). Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Dev. Biol.* **280**, 249–259.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J. and Mikoshiba, K.** (1998). Xenopus Zic family and its role in neural and neural crest development. *Mech. Dev.* **75**, 43–51.
- Nakato, H., Futch, T. A. and Selleck, S. B.** (1995). The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in Drosophila. *Development* **121**, 3687–3702.
- Nassif, C., Noveen, A. and Hartenstein, V.** (2003). Early development of the Drosophila brain: III. The pattern of neuropile founder tracts during the larval period. *J. Comp. Neurol.* **455**, 417–434.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357–368.
- Neumann, C. J.** (2001). Pattern formation in the zebrafish retina. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 485–490.
- Neumann, C. J. and Nüsslein-Volhard, C.** (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* **289**, 2137–2139.
- Niehrs, C.** (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* **15**, 314–319.
- Niehrs, C.** (2001). The Spemann organizer and embryonic head induction. *EMBO J.* **20**, 631–637.
- Niimi, T., Seimiya, M., Kloter, U., Flister, S. and Gehring, W. J.** (1999). Direct regulatory interaction of the eyeless protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in Drosophila. *Development* **126**, 2253–2260.
- Nilsson, D.-E.** (2004). Eye evolution: a question of genetic promiscuity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 407–414.
- Ninov, N., Borius, M. and Stainier, D. Y. R.** (2012). Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* **139**, 1557–1567.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I. and Furukawa, T.** (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell

- fate and pineal gland development. *Nat. Neurosci.* **6**, 1255–1263.
- Noll, M.** (1993). Evolution and role of Pax genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 595–605.
- Nüsslein-Volhard, C.** (1977). Genetic analysis of pattern-formation in the embryo of *Drosophila melanogaster*: Characterization of the maternal-effect mutant *Bicaudal*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **183**, 249–268.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **193**, 267–282.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M.** (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* **165**, 716–726.
- O’Kane, C. J. and Gehring, W. J.** (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 9123–9127.
- Oliver, G. and Gruss, P.** (1997). Current views on eye development. *Trends Neurosci.* **20**, 415–421.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P.** (1995). Six3, a murine homologue of the *sine oculis* gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045–4055.
- Opas, M. and Dziak, E.** (1994). bFGF-induced transdifferentiation of RPE to neuronal progenitors is regulated by the mechanical properties of the substratum. *Dev. Biol.* **161**, 440–454.
- Osorio, J., Mazan, S. and Rétaux, S.** (2005). Organisation of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*) embryonic brain: insights from LIM-homeodomain, Pax and hedgehog genes. *Dev. Biol.* **288**, 100–112.
- Packard, A. I., Lin, B. and Schwob, J. E.** (2016). Sox2 and Pax6 Play Counteracting Roles in Regulating Neurogenesis within the Murine Olfactory Epithelium. *PLoS One* **11**, e0155167.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. and Gelbart, W. M.** (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81–84.
- Pai, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A. and Sun, Y. H.** (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses

- eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 435–446.
- Pan, D. and Rubin, G. M.** (1998a). Targeted expression of teashirt induces ectopic eyes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15508–15512.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* **281**, 2031–2034.
- Pappu, K. S. and Mardon, G.** (2004). Genetic control of retinal specification and determination in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 913–924.
- Pappu, K. S., Ostrin, E. J., Middlebrooks, B. W., Sili, B. T., Chen, R., Atkins, M. R., Gibbs, R. and Mardon, G.** (2005). Dual regulation and redundant function of two eye-specific enhancers of the *Drosophila* retinal determination gene *dachshund*. *Development* **132**, 2895–2905.
- Peng, H. W., Slattery, M. and Mann, R. S.** (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* **23**, 2307–2319.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W. A.** (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* **130**, 1565–1577.
- Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T.-T. B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Lavery, T. R., et al.** (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9715–9720.
- Piccolino, M., Strettoi, E. and Laurenzi, E.** (1989). Santiago Ramón Y Cajal, the retina and the neuron theory. In *History of Ophthalmology*, pp. 123–141.
- Pichaud, F. and Casares, F.** (2000). homothorax and iroquois-C genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech. Dev.* **96**, 15–25.
- Pichaud, F. and Desplan, C.** (2001). A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development* **128**, 815–826.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K. H., Xiao, J., Garrity, P. A. and Zipursky, S. L.** (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* **91**, 881–891.
- Poche, R. A., Kwan, K. M., Raven, M. A., Furuta, Y., Reese, B. E. and Behringer,**

- R. R.** (2007). Lim1 Is Essential for the Correct Laminar Positioning of Retinal Horizontal Cells. *Journal of Neuroscience* **27**, 14099–14107.
- Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D., et al.** (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935–2944.
- Purcell, P., Oliver, G., Mardon, G., Donner, A. L. and Maas, R. L.** (2005). Pax6-dependence of Six3, Eya1 and Dach1 expression during lens and nasal placode induction. *Gene Expr. Patterns* **6**, 110–118.
- Püschel, A. W., Gruss, P. and Westerfield, M.** (1992a). Sequence and expression pattern of pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Development* **114**, 643–651.
- Püschel, A. W., Westerfield, M. and Dressler, G. R.** (1992b). Comparative analysis of Pax-2 protein distributions during neurulation in mice and zebrafish. *Mech. Dev.* **38**, 197–208.
- Qu, C., Bian, D., Li, X., Xiao, J., Wu, C., Li, Y., Jiang, T., Zhou, X., Qu, J. and Chen, J.-G.** (2016a). Transient Expression of Fez Family Zinc Finger 2 Protein Regulates the Brn3b Gene in Developing Retinal Ganglion Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 7661–7668.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J.** (1994). Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* **265**, 785–789.
- Ragge, N. K., Brown, A. G., Poloschek, C. M., Lorenz, B., Henderson, R. A., Clarke, M. P., Russell-Eggitt, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martinez-Barbera, J. P., et al.** (2005). Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 1008–1022.
- Ramón y Cajal (S.) y Sánchez (D.)** Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. Parte I: Retina y centros ópticos. Trab. del Laborat. de Invest. biol. de la Univ. de Madrid, tomo **XVI**, (1918).
- Rauskolb, C., Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1993). extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1. *Cell* **74**, 1101–1112.
- Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Steinmetz, B. D., Frankfort, B. J., Ostrin, E. J., Mardon, G. and Hegde, R. S.** (2003). Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* **426**, 295–298.
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L. and Perkowski, J. J.** (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult

zebrafish. *BMC Dev. Biol.* **6**, 36.

**Reddy, B. V. V. G., B V V, Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (2010a). Influence of Fat-Hippo and Notch signaling on the proliferation and differentiation of *Drosophila* optic neuroepithelia. *Development* **137**, 2397–2408.

**Reh, T. A. and Fischer, A. J.** (2001). Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav. Evol.* **58**, 296–305.

**Reh, T. A. and Levine, E. M.** (1998). Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J. Neurobiol.* **36**, 206–220.

**Reichert, H.** (2005). A tripartite organization of the urbilaterian brain: developmental genetic evidence from *Drosophila*. *Brain Res. Bull.* **66**, 491–494.

**Rembold, M., Loosli, F., Adams, R. J. and Wittbrodt, J.** (2006). Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination. *Science* **313**, 1130–1134.

**Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111.

**Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M. and Ang, S. L.** (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* **125**, 845–856.

**Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401–1416.

**Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M. and Mann, R. S.** (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171–183.

**Rivera-Alba, M., Vitaladevuni, S. N., Mishchenko, Y., Mischenko, Y., Lu, Z., Takemura, S.-Y., Scheffer, L., Meinertzhagen, I. A., Chklovskii, D. B. and de Polavieja, G. G.** (2011). Wiring economy and volume exclusion determine neuronal placement in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* **21**, 2000–2005.

**Robinow, S. and White, K.** (1988). The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* **126**, 294–303.

**Rodríguez-Seguel, E., Alarcón, P. and Gómez-Skarmeta, J. L.** (2009). The *Xenopus* *lrx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Dev. Biol.* **329**, 258–268.



- Rowan, S., Chen, C.-M. A., Young, T. L., Fisher, D. E. and Cepko, C. L.** (2004). Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene *Chx10*. *Development* **131**, 5139–5152.
- Rusconi, J. C., Hays, R. and Cagan, R. L.** (2000). Programmed cell death and patterning in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **7**, 1063–1070.
- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M. and Mann, R. S.** (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* **126**, 5137–5148.
- Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D., Simeone, A. and Driever, W.** (2007). Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr. Biol.* **17**, 873–880.
- Santos, J. S., Fonseca, N. A., Vieira, C. P., Vieira, J. and Casares, F.** (2010). Phylogeny of the teashirt-related zinc finger (*tshz*) gene family and analysis of the developmental expression of *tshz2* and *tshz3* in the zebrafish. *Dev. Dyn.* **239**, 1010–1018.
- Sasagawa, S., Takabatake, T., Takabatake, Y., Muramatsu, T. and Takeshima, K.** (2002). Axes establishment during eye morphogenesis in *Xenopus* by coordinate and antagonistic actions of BMP4, Shh, and RA. *Genesis* **33**, 86–96.
- Schmidt-Ott, U. and Technau, G. M.** (1992). Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* **116**, 111–125.
- Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M. and Lumsden, A.** (2006). Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development* **133**, 855–864.
- Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M. A., Kozak, C. A. and Cepko, C. L.** (1999). Misexpression of the *Emx*-related homeobox genes *cVax* and *mVax2* ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* **24**, 541–553.
- Seimiya, M. and Gehring, W. J.** (2000). The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* **127**, 1879–1886.
- Selleck, S. B. and Steller, H.** (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* **6**, 83–99.
- Selleck, S. B., Gonzalez, C., Glover, D. M. and White, K.** (1992). Regulation of the G1-S transition in postembryonic neuronal precursors by axon ingrowth. *Nature* **355**, 253–255.

- Seo, H. C., Curtiss, J., Mlodzik, M. and Fjose, A.** (1999). Six class homeobox genes in drosophila belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech. Dev.* **83**, 127–139.
- Serikaku, M. A. and O'Tousa, J. E.** (1994). sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development. *Genetics* **138**, 1137–1150.
- Shimizu, T. and Hibi, M.** (2009). Formation and patterning of the forebrain and olfactory system by zinc-finger genes Fezf1 and Fezf2. *Dev. Growth Differ.* **51**, 221–231.
- Shimizu, T., Yamanaka, Y., Nojima, H., Yabe, T., Hibi, M. and Hirano, T.** (2002). A novel repressor-type homeobox gene, ved, is involved in dharma/bozozok-mediated dorsal organizer formation in zebrafish. *Mech. Dev.* **118**, 125–138.
- Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R. and Hibi, M.** (2010). Zinc finger genes Fezf1 and Fezf2 control neuronal differentiation by repressing Hes5 expression in the forebrain. *Development* **137**, 1875–1885.
- Sigulinsky, C. L., Green, E. S., Clark, A. M. and Levine, E. M.** (2008). Vsx2/Chx10 ensures the correct timing and magnitude of Hedgehog signaling in the mouse retina. *Dev. Biol.* **317**, 560–575.
- Simões, B. M. and Vivanco, M. D.** (2011). Cancer stem cells in the human mammary gland and regulation of their differentiation by estrogen. *Future Oncol.* **7**, 995–1006.
- Silver, S. J., Davies, E. L., Doyon, L. and Rebay, I.** (2003). Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5989–5999.
- Simeone, A.** (2000). Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2 meet. *Trends Genet.* **16**, 237–240.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V. and Boncinelli, E.** (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* **12**, 2735–2747.
- Singh, A., Kango-Singh, M. and Sun, Y. H.** (2002). Eye suppression, a novel function of teashirt, requires Wingless signaling. *Development* **129**, 4271–4280.
- Singh, A., Kango-Singh, M., Choi, K.-W. and Sun, Y. H.** (2004). Dorso-ventral asymmetric functions of teashirt in Drosophila eye development depend on spatial cues provided by early DV patterning genes. *Mech. Dev.* **121**, 365–370.
- Sinigaglia, C., Busengdal, H., Leclère, L., Technau, U. and Rentzsch, F.** (2013).

The bilaterian head patterning gene *six3/6* controls aboral domain development in a cnidarian. *PLoS Biol.* **11**, e1001488.

**Sinn, R. and Wittbrodt, J.** (2013). An eye on eye development. *Mech. Dev.* **130**, 347–358.

**Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Mintz-Hittner, H. A., Birch, D., Heckenlively, J. R., Freund, C. L., McInnes, R. R. and Daiger, S. P.** (1998). A range of clinical phenotypes associated with mutations in *CRX*, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1307–1315.

**Southall, T. D., Elliott, D. A. and Brand, A. H.** (2008). The GAL4 System: A Versatile Toolkit for Gene Expression in *Drosophila*. *CSH Protoc.* **2008**, db.top49.

**Spemann H.** (1901). Über Correlationen in der Entwicklung des Auges. Ver. Anat. Ges. 15:61–79

**Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M.** (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **28**, 451–461.

**Star, E. N., Zhu, M., Shi, Z., Liu, H., Pashmforoush, M., Sauve, Y., Bruneau, B. G. and Chow, R. L.** (2012). Regulation of retinal interneuron subtype identity by the Iroquois homeobox gene *Ir6*. *Development* **139**, 4644–4655.

**Stern, C. D.** (2006). Neural induction: 10 years on since the “default model.” *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 692–697.

**Straznick, K. and Gaze, R. M.** (1971). The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **26**, 67–79.

**Stroeva, O. G. and Mitashov, V. I.** (1983). Retinal Pigment Epithelium: Proliferation and Differentiation during Development and Regeneration. In *International Review of Cytology*, pp. 221–293.

**Struhl, G. and Basler, K.** (1993a). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527–540.

**Sun, D.-G. and Da-Guang, S.** (2008). A novel *PAX6* mutation (c.1286delC) in the patients with hereditary congenital aniridia. *Hereditas* **30**, 1301–1306.

**Swaroop, A., Kim, D. and Forrest, D.** (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 563–576.

**Tabata, T. and Takei, Y.** (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703–712.

- Take-uchi, M., Clarke, J. D. W. and Wilson, S. W.** (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development* **130**, 955–968.
- Tavsanli, B. C., Ostrin, E. J., Burgess, H. K., Middlebrooks, B. W., Pham, T. A. and Mardon, G.** (2004). Structure-function analysis of the Drosophila retinal determination protein Dachshund. *Dev. Biol.* **272**, 231–247.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K. F. and Pongs, O.** (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* **14**, 287–301.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. and Hartenstein, V.** (1996). shotgun encodes Drosophila E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev.* **10**, 672–685.
- Thisse, C., and Thisse, B.** (2005) High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones Journal: ZFIN Direct Data Submission
- Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. and Piatigorsky, J.** (1997). Squid Pax-6 and eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2421–2426.
- Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N. D., Meijers-Heijboer, H. and Drechsler, M.** (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* **67**, 1059–1074.
- Tootle, T. L., Silver, S. J., Davies, E. L., Newman, V., Latek, R. R., Mills, I. A., Selengut, J. D., Parlikar, B. E. W. and Rebay, I.** (2003). The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **426**, 299–302.
- Toy, J., Yang, J. M., Leppert, G. S. and Sundin, O. H.** (1998). The optx2 homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10643–10648.
- Treisman, J. E. and Heberlein, U.** (1998). Eye development in Drosophila: formation of the eye field and control of differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **39**, 119–158.
- Treisman, J. E. and Rubin, G. M.** (1995). wingless inhibits morphogenetic furrow movement in the Drosophila eye disc. *Development* **121**, 3519–3527.
- Turner, D. L. and Cepko, C. L.** (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**, 131–136.

- Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M. and Tabata, T.** (2006). The highly ordered assembly of retinal axons and their synaptic partners is regulated by Hedgehog/Single-minded in the Drosophila visual system. *Development* **133**, 791–800.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2007). Segmental Organization of Cephalic Ganglia in Arthropods. In *Evolution of Nervous Systems*, pp. 337–348.
- Varga, Z. M., Wegner, J. and Westerfield, M.** (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* **126**, 5533–5546.
- Viczian, A. S., Vignali, R., Zuber, M. E., Barsacchi, G. and Harris, W. A.** (2003). XOt5b and XOt2 regulate photoreceptor and bipolar fates in the Xenopus retina. *Development* **130**, 1281–1294.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. and Giangrande, A.** (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131–139.
- Wada, H., Saiga, H., Satoh, N. and Holland, P. W.** (1998). Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian Pax-2/5/8, Hox and Otx genes. *Development* **125**, 1113–1122.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435–1449.
- Wang, W. and Lufkin, T.** (2000). The Murine Otp Homeobox Gene Plays an Essential Role in the Specification of Neuronal Cell Lineages in the Developing Hypothalamus. *Dev. Biol.* **227**, 432–449.
- Wang, S. W., Kim, B. S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R. L., Klein, W. H. and Gan, L.** (2001). Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev.* **15**, 24–29.
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S. and Martin, G. R.** (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* **124**, 2923–2934.
- Watanabe, Y., Inoue, K., Okuyama-Yamamoto, A., Nakai, N., Nakatani, J., Nibu, K.-I., Sato, N., Iiboshi, Y., Yusa, K., Kondoh, G., et al.** (2009). Fezf1 is required for penetration of the basal lamina by olfactory axons to promote olfactory development. *J. Comp. Neurol.* **515**, 565–584.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A. T., Robertson, E. J. and Maas, R.** (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev. Biol.* **207**, 176–188.

- Weasner, B., Salzer, C. and Kumar, J. P.** (2007). Sine oculis, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation. *Dev. Biol.* **303**, 756–771.
- Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. and Chambon, P.** (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**, 169–178.
- Weng, M., Golden, K. L. and Lee, C.-Y.** (2010a). dFzef/Earmuff maintains the restricted developmental potential of intermediate neural progenitors in *Drosophila*. *Dev. Cell* **18**, 126–135.
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschläger, M., Pera, E. M. and De Robertis, E. M.** (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **234**, 161–173.
- Westenskow, P., Piccolo, S. and Fuhrmann, S.** (2009). Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Development* **136**, 2505–2510.
- Wetts, R., Serbedzija, G. N. and Fraser, S. E.** (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.* **136**, 254–263.
- White, K. and Kankel, D. R.** (1978). Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **65**, 296–321.
- Wilson, S. W. and Houart, C.** (2004). Early Steps in the Development of the Forebrain. *Dev. Cell* **6**, 167–181.
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr. Biol.* **10**, 421–429.
- Wilson, C., Pearson, R. K., Bellen, H. J., O’Kane, C. J., Grossniklaus, U. and Gehring, W. J.** (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 1301–1313.
- Wolff, T. and Ready, D. F.** (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841–850.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223–1237.

- Xu, Z. P. and Saunders, G. F.** (1997a). Transcriptional regulation of the human PAX6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 3430–3436.
- Xu, P. X., Woo, I., Her, H., Beier, D. R. and Maas, R. L.** (1997b). Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development* **124**, 219–231.
- Xu, H., Sta Iglesia, D. D., Kielczewski, J. L., Valenta, D. F., Pease, M. E., Zack, D. J. and Quigley, H. A.** (2007). Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1674–1682.
- Yang, Z., Liu, N. and Lin, S.** (2001). A zebrafish forebrain-specific zinc finger gene can induce ectopic dlx2 and dlx6 expression. *Dev. Biol.* **231**, 138–148.
- Yang, N., Dong, Z. and Guo, S.** (2012). Fezf2 regulates multilineage neuronal differentiation through activating basic helix-loop-helix and homeodomain genes in the zebrafish ventral forebrain. *J. Neurosci.* **32**, 10940–10948.
- Yasugi, T., Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M. and Tabata, T.** (2008). Drosophila optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. *Development* **135**, 1471–1480.
- Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D. and Tabata, T.** (2010). Coordinated sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the Drosophila optic lobe. *Development* **137**, 3193–3203.
- Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M. and Tabata, T.** (2005a). DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of Drosophila. *Development* **132**, 4587–4598.
- Young, R. W.** (1985a). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* **212**, 199–205.
- Young, R. W.** (1985b). Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res.* **353**, 229–239.
- Younossi-Hartenstein, A., Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1993). Embryonic origin of the imaginal discs of the head of Drosophila melanogaster. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 60–73.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K. E., Kopinke, D., Murtaugh, L. C., Monuki, E. S. and Levine, E. M.** (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* **136**, 3895–3906.
- Zagozewski, J. L., Zhang, Q. and Eisenstat, D. D.** (2014). Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin. Genet.* **86**, 453–460.

- Zhang, L., Mathers, P. H. and Jamrich, M.** (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28**, 135–142.
- Zhang, X., Friedman, A., Heaney, S., Purcell, P. and Maas, R. L.** (2002). Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 2097–2107.
- Zhang, X., Rowan, S., Yue, Y., Heaney, S., Pan, Y., Brendolan, A., Selleri, L. and Maas, R. L.** (2006). Pax6 is regulated by Meis and Pbx homeoproteins during pancreatic development. *Dev. Biol.* **300**, 748–757.
- Zhang, Q., Cheng, S. and Eisenstat, D.** (2009). Dlx transcription factors regulate the Brn3b homeobox gene during vertebrate retina development. *Dev. Biol.* **331**, 431.
- Zhang, Q., Zagozewski, J., Cheng, S., Dixit, R., Zhang, S., de Melo, J., Mu, X., Klein, W. H., Brown, N. L., Wigle, J. T., et al.** (2017). Regulation of Brn3b by DLX1 and DLX2 is required for retinal ganglion cell differentiation in the vertebrate retina. *Development* **144**, 1698–1711.
- Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B. and Benzer, S.** (1984). Neuronal development in the Drosophila retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* **36**, 15–26.
- Zuber, M. E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A. and Harris, W. A.** (1999). Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell* **98**, 341–352.
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A.** (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155–5167.





## AGRADECIMIENTOS

No podía terminar esta tesis, que tanto tiempo me ha llevado, sin agradecer a quienes me han acompañado en el camino y me han aportado tantas cosas positivas. Tengo la gran suerte de tener una larga lista de personas a las que agradecer su apoyo, su ayuda y su amistad.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi mentor, Acaimo González, que me dio la oportunidad de flirtear con la ciencia cuando aún era una estudiante Universitaria. Gracias por confiar en mí, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, dedicarme tu tiempo y gracias por tus consejos y apoyo durante los cinco años que estuve trabajando en esta tesis. Ha sido un placer aprender de ti.

Y como no, gracias a Fernando Casares, por darme la oportunidad de aprender ciencia de la mano de alguien tan sobresaliente en su trabajo y con tan buen criterio científico. Me quedo con tu gran entusiasmo por la ciencia, hasta el punto de ser contagioso y con todo lo que he aprendido de ti, que es mucho. Gracias por enseñarme a hacer las cosas bien y darme caña en los “lab meetings”, y por estar siempre disponible para cualquier consulta. En definitiva, gracias por guiarme durante los cinco años de mi tesis y por confiar en mí para este trabajo.

Muchas gracias a Manolo Ruiz, mi tutor, por su disponibilidad y su apoyo.

Gracias a la Dr. Dorothea Schulte por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, hacer suyo mi proyecto, poniendo todo su empeño y por todo lo aprendido con ella. Gracias por acogerme y enseñarme Frankfurt y sus alrededores. Dankeschön.

Gracias a Lola Bermudez por sus charlas y consejos. También recordaré las charlas con James Castelli en la sala de las moscas y sus golpes de humor. Agradezco en general a los laboratorios de Jaime, J. Culi, Lola, Acaimo y Dani, por el buen ambiente de trabajo creado y por promover la colaboración en toda la comunidad de *Drosophila*. Ha sido un placer compartir reactivos, ideas, protocolos, charlas etc. con todos ellos. Gracias también a Skarmeta y a los miembros de su laboratorio, he disfrutado cada uno de sus seminarios y he aprendido mucho de ellos.

No quiero olvidarme de agradecer a todo el personal de cocinas que hace posible el funcionamiento de los laboratorios, así como el personal de administración por ayudarme siempre con todo el papeleo. También a Vanessa por su sonrisa cada mañana en recepción. A las limpiadoras y a “Pachú” por su trabajo y por su simpatía.

Gracias a Kathy, Corín y Leti de microscopía, especialmente a Kathy por pasar conmigo tantas horas en el “cell sorter”.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Acaimo, cuando estuve de prácticas, Lourdes, Ivette, Ana, Patri, Alfonsa, y sobre todo gracias a John Pearson por su ayuda y por los buenos ratos compartidos. También a los miembros del laboratorio de Lola: Laura, Beatriz, Pepe, y cómo no, a Ceci, M Jesús y Clara por tantos buenos momentos. Gracias a mi buena

amiga Fati, por sus abrazitos antiestrés, su apoyo incondicional y por escucharme en todo momento.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y por crear un ambiente de trabajo tan estupendo. He aprendido mucho de Carla, y cómo no, de Carlos que siempre está dispuesto a ayudar. Gracias también a Maria, Ana Sara, Marta, Catarina y Joana (Xu). Muchas gracias a mi trío favorito, Lola, M Angeles y Jorgito, por nuestros buenos ratitos en los descansos y por compartir tantos otros momentos. Me quedo con el carácter fuerte y divertido de Lola, con las charlas concienzudas de M Angeles, a quien admiro por su valor y honestidad, y con la sonrisa contagiosa y el positivismo de Jorge. Trabajar con vosotros hace más amenos los momentos más difíciles. Tampoco olvidaré los fines de semana trabajando hasta tarde en el lab con Xu y Carlos, y los momentos de locura escuchando los Fraggles a última hora para cantar como posesos la canción de los “curris”. Gracias a Anto por mantener el orden en el lab y por cuidar de que todo funcione. Me he reído mucho contigo también.

Agradezco a Jose Bessa por sus consejos, ha sido un placer aprender de ti y de tu trabajo.

Y a muchos otros, con quien he compartido buenos momentos, como, David, Carlitos, Jose, Rafa, María, Ana María, Marisa y un largo etc....

También quiero agradecer a mis amigos y compañeros de profesión, Pili, Luis, Juan, Alberto y Cristi, por vuestros consejos, vuestro apoyo y sobre todo por vuestra amistad, tan importante para mí en los momentos difíciles.

A lo largo de los cinco años que he trabajado en esta tesis ha habido personas que han estado a mi lado y me han brindado su apoyo y comprensión. Gracias a Angela por estar ahí. Gracias Gorka por el apoyo recibido y por tus consejos. Gracias canija (Sandra) porque son muchos los momentos compartidos y siempre has estado ahí en los buenos y malos momentos, y siempre me has ayudado. Muchas gracias a Juanjo por enseñarme a confiar en mi misma, sin tu ayuda no estaría escribiendo estas líneas.

Gracias a mi compañero, Carsten, por confiar ciegamente en mis capacidades, por darme aliento y apoyo, gracias por poder contar contigo en todo momento. Gracias por tu comprensión sin límites durante la escritura de esta tesis. Vielen Dank für die Unterstützung, meines Schätzchen.

Finalmente y muy importante para mí, no puedo dejar de agradecer el apoyo de mi familia, que aunque la mayoría no terminan de entender en que narices he estado trabajando durante 5 años :-P, sólo saben que me peleaba con las moscas cada día, han estado ahí en todo momento. Gracias a mi padre por escucharme y esforzarse en entenderme cuando le hablo de ciencia. En especial quiero agradecer a mi madre, por haberme respetado y apoyado en cada una de mis decisiones, desde que con 13 años le dije que quería ser bióloga. Gracias mamá por enseñarme a luchar por lo que quiero y a ser independiente y resuelta, y por ser todo un ejemplo para mí. Gracias a todos mis hermanos, Toñin, Viky, Emi y Miguel, por estar ahí en los buenos y malos momentos, por vuestros consejos, por esforzaros en entender mi trabajo, y por darme ánimos para seguir.

Quiero agradecer también a mi familia paterna (primos y tíos) por su apoyo, y a mi antepasado Don Manuel Ventura Figueroa por la ayuda económica recibida durante el último año de tesis de su fundación para el estudio y la ciencia, la más antigua de España.

